

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**Papel VEGF en la actividad vascular y en el tejido adiposo peritumoral
en el carcinoma colorrectal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Óscar García Villar

Directores

Eduardo Ferrero Herrero

Miriam Granado García

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN MÉDICO-QUIRÚRGICA



**PAPEL DEL VEGF EN LA ACTIVIDAD VASCULAR Y
EN EL TEJIDO ADIPOSO PERITUMORAL
EN EL CARCINOMA COLORRECTAL.**

OSCAR GARCÍA VILLAR

MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN MÉDICO-QUIRÚRGICA



**PAPEL DEL VEGF EN LA ACTIVIDAD VASCULAR Y
EN EL TEJIDO ADIPOSO PERITUMORAL
EN EL CARCINOMA COLORRECTAL.**

OSCAR GARCÍA VILLAR

DIRECTORES

DOCTOR EDUARDO FERRERO HERRERO

DOCTORA MIRIAM GRANADO GARCÍA

MADRID, 2015



Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía

El Doctor Eduardo Ferrero Herrero, Jefe de Servicio de Cirugía General, del Aparato Digestivo y Trasplante del Hospital Universitario 12 de Octubre, Profesor Asociado de Cirugía, Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, acreditación de Profesor Contratado Doctor Área de Cirugía (ANECA) y la Doctora Miriam Granado García, Profesor Ayudante Doctor de Fisiología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN: Que D. Oscar García Villar ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **PAPEL DEL VEGF EN LA ACTIVIDAD VASCULAR Y EN EL TEJIDO ADIPOSEO PERITUMORAL EN EL CARCINOMA COLORRECTAL**, como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor dentro del Programa de Doctorado del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Para que conste, firmamos el presente en Madrid a 12 de octubre de 2015.

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL

El tema del presente estudio es de gran trascendencia en la actualidad por la elevada morbi-mortalidad que comporta el carcinoma colorrectal y a su vez permite evaluar su relación con la obesidad. Podemos llevar a cabo el planteamiento de nuevas y más eficaces alternativas terapéuticas lo que abre un esperanzador futuro para esta enfermedad.

En la Introducción se actualiza éste tema con una bibliografía que recoge los trabajos clásicos, así como las últimas publicaciones científicas, sobre la fisiopatología del crecimiento tumoral y de la relación del carcinoma colorrectal con la obesidad. La hipótesis y los objetivos del trabajo son claros y concisos.

El Material y Métodos se caracteriza por su rigor metodológico, dada la complejidad del trabajo. El diseño experimental es correcto y está suficientemente explicado como para permitir reproducir los experimentos y las técnicas utilizadas en el trabajo a otros investigadores.

Los Resultados de éste estudio permiten verificar la hipótesis de Investigación y se exponen con gran claridad, incluyéndose numerosas Tablas y Figuras que permiten una comprensión clara de los principales resultados.

Finalmente, en la Discusión se integran todos los datos obtenidos tras el estudio de las alteraciones que comporta esta patología.

Las Conclusiones obtenidas en éste estudio son de gran interés porque demuestran la utilidad de los presentes resultados en la clínica humana. La importancia de éste trabajo de investigación se fundamentaría por tanto en que sus resultados permiten, en primer lugar un mejor conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en el crecimiento tumoral en el cáncer de colon, de la relación del mismo con la obesidad y además supone una esperanzadora opción terapéutica para los pacientes que lo sufren.

Por todas las razones expuestas consideramos que este trabajo de investigación es de indudable valor en el campo de la cirugía y que puede optar su autor a la obtención del Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Este trabajo se ha realizado, en parte, con ayudas del FIS (P-1050994), del Programa de Promoción de la Investigación Biomédica y en Ciencias de la Salud del Ministerio de Sanidad y Consumo (PI-050994/05), de la Fundación Mutua de Investigación (AP-57242009) y del Grupo de Investigación en Neoplasia Colorrectal (INVESCOL) (REF 911644/08 y 911644/10). Quede constancia de mi agradecimiento.

QUIERO EXPRESAR MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO

A los directores de esta tesis, profesores ejemplares del arte de la medicina y de la cirugía:

Al Dr. E. Ferrero Herrero, Jefe de Servicio de Cirugía General, del Aparato Digestivo y Trasplante del Hospital Universitario 12 de Octubre y Profesor Asociado de Cirugía, Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por transmitirme el entusiasmo con el que desarrolla cada proyecto y por honrarme con su amistad. Su insistencia y su perseverancia me han traído hasta aquí.

A la Dra. Miriam Granado García, Profesor Ayudante Doctor de Fisiología, Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología de la Universidad Autónoma de Madrid, por su inestimable ayuda y sus consejos a la hora de elaborar la tesis.

A todos los compañeros del Servicio de Cirugía Digestivo “B” del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid por su amistad y enseñanzas.
A todos los “Vilariños” que andan por el mundo.

Al Dr. A. L. García Villalón, Catedrático de Fisiología, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, por su labor científica, por su capacidad de trabajo y por la amabilidad con la que me ha prestado su colaboración.

A la Dra. María Labalde Martínez por abrir el camino.

A Manuel Ortiz por su ayuda con los idiomas.

Al Servicio de Rehabilitación del Hospital 12 de Octubre por acogerme.

A los compañeros del Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario Infanta Cristina de Parla por hacerme sentir como en casa.

A todos los pacientes que he tenido la suerte de atender.

Al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, por permitirme trabajar con ellos.

A las enfermeras de los quirófanos 35 y 36 del Hospital 12 de Octubre.

A toda mi familia y todos mis amigos, por su compañía y cariño.

A mis padres por su esfuerzo y por los sacrificios que han tenido que soportar para hacerme llegar hasta aquí. A mis hermanos por su apoyo y las horas de sueño que les he quitado.

Y, en especial, a mi mujer y mis hijas, a las que dedico esta tesis, porque gracias a ellas mantengo la ilusión y hacen que me esfuerce por ser mejor cada día.

A Irene, Araceli y Sandra

ÍNDICE

ÍNDICE

	Número de página
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE TABLAS	XXIV
 RESUMEN	 1
 SUMMARY	 7
 1. INTRODUCCIÓN	 12
1.1 IMPORTANCIA CLÍNICA DEL CÁNCER DE COLON Y RECTO	13
1.1.1. Diagnóstico del cáncer colorrectal	15
1.1.2. Vías de diseminación del cáncer colorrectal	17
1.1.3. Clasificación y estadios del cáncer colorrectal	19
1.1.4. Pronóstico y tasas de supervivencia	23
1.1.5. Tratamiento quirúrgico del cáncer colorrectal	24
1.2. ANATOMÍA DE LAS ARTERIAS DEL COLON Y RECTO	31
1.2.1. Arterias que irrigan el colon	31
1.2.2. Arterias que irrigan el recto	32
1.3. ANGIOGÉNESIS TUMORAL	34
1.4. IMPORTANCIA DEL ENDOTELIO VASCULAR EN EL CÁNCER	38

	Número de página
1.5. FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)	41
1.6. RESPUESTA VASCULAR Y VEGF EN LAS ARTERIAS DE LOS CARCINOMAS COLORRECTALES	49
1.7. OBESIDAD	53
1.8. CÁNCER COLORRECTAL Y OBESIDAD	57
2. OBJETIVOS	60
3. MATERIAL Y MÉTODOS	63
3.1. PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ARTERIAL	64
3.1.1. Características clínicas de los pacientes de los que se obtuvieron los segmentos arteriales	64
3.1.2. Recolección de las arterias mesentéricas humanas	70
3.1.3. Registro de la respuesta vascular	73
3.1.4. Aislamiento de RNA y análisis RT- PCR	78
3.1.5. Análisis Western blot	79
3.1.6. Análisis estadístico	80
3.1.7. Fármacos utilizados	80
3.2. PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INFLAMATORIA DE LA GRASA VISCERAL	81
3.2.1. Características clínicas de los pacientes en los que se han obtenido las muestras	81
3.2.2. Recogida de muestra de plasma	84

	Número de página
3.2.3. Recogida de muestras de tejido adiposo visceral	84
3.2.4. Inmunoensayo multiplex de la muestra	85
3.2.5. Cultivos de explantes de tejido adiposo visceral	86
3.2.6. Aislamiento y cultivo de adipocitos maduros	87
3.2.7. Determinación de nitritos y nitratos en el medio de cultivo	88
3.2.8. ARN preparación y purificación	88
3.2.9. PCR cuantitativa en tiempo real	89
3.2.10. Análisis estadístico	90
4. RESULTADOS	91
4.1. ESTUDIO VASCULAR	92
4.1.1. Respuesta de las arterias al ortovanadato sódico en presencia/ausencia de genisteína	92
4.1.2. Respuestas de las arterias a la noradrenalina en presencia/ausencia de ortovanadato sódico	94
4.1.3. Respuesta de las arterias a la bradiquinina en presencia/ausencia de ortovanadato	95
4.1.4. Expresión génica de los receptores de VEGF en tejido arterial	96
4.1.5. Expresión proteica de los receptores de VEGF en tejido arterial	97
4.2. ESTUDIO DE LOS NIVELES SÉRICOS DE FACTORES PRO-INFLAMATORIOS Y ANGIOGÉNICOS	98

	Número de página
4.3. ESTUDIO DEL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL	100
4.3.1. Concentraciones de nitritos y nitratos en explantes de tejido adiposo visceral abdominal	100
4.3.2. Concentraciones de nitritos y nitratos en los adipocitos maduros aisladas de tejido adiposo visceral abdominal	103
4.3.3. Expresión génica de la adiponectina, IL-6, IL-10 y TNF- α en explantes TF	105
4.3.4. Expresión génica del IGF-I y del VEGF en explantes TF	109
4.3.5. Expresión génica de COX-2 y PPAR-gamma en explantes TF	111
4.3.6. Concentraciones de nitritos y nitratos de explantes y de adipocitos maduros de TF en respuesta al LPS en presencia de meloxicam y BADGE	113
5. DISCUSIÓN	115
6. CONCLUSIONES	132
7. BIBLIOGRAFÍA	135

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico cíclico
AMP	Adenosina monofosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
APC	Adenomatous polyposis coli
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASA	American Society of Anesthesiologists
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
BADGE	Éter bisfenol -A- diglicídico

Bcl-2	Protooncogén linfoma de células B
CaCl ₂	Cloruro cálcico
CC	Cáncer colorrectal
CO ₂	Dióxido carbónico
Cols	Colaboradores
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CSF-1R	Factor estimulante de colonias dependiente de macrófagos 1
Cys	Cisteína
DLL4	Receptor Delta-like 4
DMEM:F12	Medio Eagle Modificado de Dulbecco:Mezcla de nutrientes F- 12
EDHF	Factor hiperpolarizante dependiente de endotelio
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
E max	Efecto máximo
EPO	Eritropoyetina
ET-1	Endotelina-1
FGF	Factor de crecimiento de fibroastos
FGFR	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
FLT-1	Receptor VEGF (VEGFR1). Receptor tiroxin kinasa
g	Gramo
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Gln	Glutamina
Glu	Glucosa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
GMP	Guanosín monofosfato
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico

Hab	Habitantes
HGF	Factor de crecimiento hepatocitario
His	Histidina
HIF	Factor inducible por hipoxia
hMSH1	Proteína MutS homólogo 1
hMSH2	Proteína MutS homólogo 2
HPRT	Fosforibosiltransferasa hipoxantina-guanina
IFN- γ	Interferón gamma
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IgG1	Inmunoglobulina G1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10

IMC	Índice de masa corporal
IMiDs	Medicamentos inmunomoduladores
KDR	Receptor del dominio de inserción de quinasa
KH ₂ PO ₄	Fósforo de potasio monobásico
Leu	Leucina
LPS	Lipopolisacárido (endotoxina)
Lys	Lisina
Log M	Logaritmo decimal de la concentración molar
L-NAME	Nitro-L-arginina metiléster
M	Mol
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
Met	Metionina
mg	Miligramo
MgSO ₄	Sulfato de magnesio
ml	Mililitro
mM	Milimol

mm	Milimetro
Mx	Meloxicam
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloruro sódico
NaHCO ₃	Bicarbonato sódico
NaK	Clóruro potásico
NaNO ₂	Nitrito de sodio
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Nitrito
NO ₃	Nitrato
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
NOB-CC	Paciente no obeso con carcinoma colorrectal.
NOS	Óxido nítrico sintasa
ns	No significativa
NTF	Grasa no tumoral

O ₂	Oxígeno
OB-CC	Paciente obeso con carcinoma colorrectal
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pD2	Sensibilidad vascular
PDGF	Factor de crecimiento vascular dependiente de plaquetas
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento vascular dependiente de plaquetas
PET	Tomografía por emisión de positrones
pg	Picogramos
PGE-2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina
Phe	Fenilalanina
PIGF	Factor de crecimiento placentario.

PPAR-gamma	Factor proliferador de peroxisomas gamma
Rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Ser	Serina
TAC	Tomografía axial computarizada
TF	Grasa peritumoral
TGF-beta	Factor de crecimiento transformante beta
TKIs	Inhibidores de la tirosin-kinasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNM	Tumor – nódulo – metástasis
Trp	Triptófano
TxA2	Tromboxano A2
Tyr	Tirosina
UICC	International Union Against Cancer
Val	Valina

VDA	Agentes disruptores vasculares
VEGF	Factor de crecimiento vascular dependiente de endotelio
VEGFR	Receptor del VEGF
VEGFR1	Receptor 1 del VEGF o FLT1
VEGFR2	Receptor 2 del VEGF o KDR.
VHA	Virus Hepatitis A
VHB	Virus Hepatitis B
VHC	Virus Hepatitis C
VIH	Virus Inmunodeficiencia Humana
VPF	Factor de permeabilidad vascular
Å	Ångström
$\Delta\Delta CT$	Método de la comparación de Ct
μl	Microlitro
μM	Micromolar
°C	Grado Centígrado

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Colonoscopia con cáncer de colon

FIGURA 2. Enema opaco con neoplasia de sigma

FIGURA 3. Tomografía axial computarizada con neoplasia de recto

FIGURA 4. Tomografía axial computarizada con metástasis hepáticas

FIGURA 5. Clasificación TNM del cáncer de colon y recto

FIGURA 6. Colectomía derecha

FIGURA 7. Pieza de colectomía derecha con cáncer de colon derecho

FIGURA 8. Resección del colon transverso

FIGURA 9. Colectomía izquierda

FIGURA 10. Resección de sigma

FIGURA 11. Pieza de resección anterior baja por cáncer de recto

FIGURA 12. Anastomosis término-terminal

FIGURA 13. Anastomosis latero-lateral

FIGURA 14. Arteria mesentérica superior y sus ramas

FIGURA 15. Arteria mesentérica inferior y sus ramas

FIGURA 16. Arterias que irrigan el recto

FIGURA 17 (A y B). Vasos sanguíneos tumorales en el cáncer de colon.
Tinción hematoxilina-eosina (20x y 40 x)

FIGURA 18. Mecanismo vasodilatador del óxido nítrico.

FIGURA 19. Síntesis de prostaciclina.

FIGURA 20. Molécula de VEGF.

FIGURA 21. Familia de los factores VEGF y de sus receptores.

FIGURA 22. Formas de VEGF según splicing.

FIGURA 23. VEGF y su acción transmembrana.

FIGURA 24. Las características del tumor y el medio ambiente promueven la expresión del VEGF.

FIGURA 25. Angiogenesis.

FIGURA 26. El aumento en el número de cirugías bariátricas es un indicador del aumento en la prevalencia de la obesidad mórbida.

FIGURA 27. Arteriografía de una pieza de resección anterior baja por cáncer de recto mediante la canalización de la arteria mesentérica inferior. Arterias tumorales y arterias alejadas del tumor.

FIGURA 28. Representación esquemática del tipo de arterias utilizadas en el estudio

FIGURA 29. Disección de las arterias tras extirpar la pieza quirúrgica.

FIGURA 30. Muestras preparadas para el estudio.

FIGURA 31. Disección arterial bajo el microscopio óptico en el laboratorio de Fisiología.

FIGURA 32. Segmentos arteriales.

FIGURA 33. Baño Arterial de Krebs-Henseleit.

FIGURA 34. Representación esquemática del montaje experimental utilizado para el registro de la tensión isométrica

FIGURA 35. La contracción en respuesta al ortovanadato sódico (10^{-4} - 10^{-2} M) de las arterias mesentéricas que suministran sangre a los tumores colorrectales (tumor, $n = 10$) y aquellas que suministran al colon normal (control, $n = 9$), en ausencia o en presencia de genisteína (10^{-4} M, $n = 4$). Los valores representan la media \pm error estándar de la media. * $P < 0.05$ estadísticamente significativa frente control.

FIGURA 36. La contracción en respuesta a la noradrenalina (10^{-9} - 10^{-4} M) de las arterias mesentéricas que suministran sangre a los tumores colorrectales (tumores, $n = 6$) y aquellos que la suministran al colon normal (control, $n = 6$), tratados o no tratados ($n = 6-7$) con ortovanadato sódico (10^{-3} M). Los valores representan la media \pm error estándar de la media. ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$ estadísticamente significativo en comparación con los segmentos no tratados.

FIGURA 37. Relajación en respuesta a la bradikina (10^{-9} - 10^{-5} M) de arterias mesentéricas que suministran sangre a los tumores colorrectales (tumores, $n = 7$) y aquellas que la suministran al colon normal (control, $n = 7$), precontraídas

con U46619 tratadas y no tratadas ($n = 8$) con sodio ortovanadato (10^{-3} M). Los valores se representan como la media \pm error estándar de la media. * $P < 0,05$ estadísticamente significativa en comparación con los segmentos no tratados.

FIGURA 38. Análisis RT-PCR de la expresión de ARNm para VEGF-A, FLT1 y KDR en las arterias mesentéricas que suministran sangre a los tumores colorrectales (tumor, $n = 6$) y los que la suministran al colon normal (control, $n = 6$). Los valores se normalizaron a la expresión del ARNm GAPDH. Los datos son presentan como media \pm error estándar de la media. * $P < 0.05$ estadísticamente significativa frente muestras de control.

FIGURA 39. Expresión de proteínas en las arterias mesentéricas que suministran sangre a los tumores colorrectales (T, $n = 10$) y las que lo hacen al colon normal (C, $n = 10$). VEGF-A, FLT1, KDR y la expresión de α -tubulina se determinaron por Western Blot. Los datos se presentan como medias \pm error estándar de la media. * $P < 0,05$ estadísticamente significativo en comparación con las muestras de control.

FIGURA 40. Concentraciones basales de nitritos y nitratos procedentes de explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes con carcinoma colorrectal. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media ($n = 6$ explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (* $P < 0,05$ frente a control).

FIGURA 41. Concentraciones de nitritos y nitratos inducidas por LPS procedentes de explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de

pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes con carcinoma colorrectal. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (# P < 0.05 vs NTF; ## P < 0.01 vs NTF).

FIGURA 42. Gráfica de liberación de nitritos y nitratos en pacientes NOB-CC Y OB-CC. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (\$\$ P < 0.01 vs NOB-CC).

FIGURA 43. Concentraciones basales de nitritos y nitratos procedentes de adipocitos maduros de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes con carcinoma colorrectal. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (* P < 0,05 frente a control).

FIGURA 44. Concentraciones de nitritos y nitratos inducidas por LPS procedentes de adipocitos maduros de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes con carcinoma colorrectal. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (# P < 0.05 vs NTF; ## P < 0.01 vs NTF).

FIGURA 45. Expresión génica de la adiponectina en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4

pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS).

FIGURA 46. Expresión génica de la IL-6 en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS; e = diferencia estadísticamente significativa de OB-CC).

FIGURA 47. Expresión génica de la IL-10 en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS; e = diferencia estadísticamente significativa de OB-CC).

FIGURA 48. Expresión génica del TNF- α en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y

pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; e = diferencia estadísticamente significativa de OB-CC).

FIGURA 49. Expresión génica del IGF-1 en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS).

FIGURA 50. Expresión génica del IGF-1 en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS).

FIGURA 51. Expresión génica de COX-2 en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y

pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; e = diferencia estadísticamente significativa de OB-CC).

FIGURA 52. Expresión génica de PPARG-gamma en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS).

FIGURA 53. Liberación de nitritos y nitratos en explantes de grasa, basal y en respuesta al LPS en pacientes OB-CC en ausencia (CONTROL) y en presencia de meloxicam (10^{-9} M) y de bisfenol A diglicidiléter (BADGE) (10^{-9} M). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a meloxicam 10^{-9} M; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS; e = diferencia estadísticamente significativa frente a BADGE 10^{-9} M).

FIGURA 54. Liberación de nitritos y nitratos en explantes de grasa, basal y en respuesta al LPS en pacientes OB-CC en ausencia (CONTROL) y en presencia

de meloxicam (10^{-9} M) y de bisfenol A diglicidiléter (BADGE) (10^{-9} M). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media ($n = 6$ explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a meloxicam 10^{-9} M; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS; e = diferencia estadísticamente significativa frente a BADGE 10^{-9} M).

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Supervivencia a los 5 años en el cáncer de colon y recto

TABLA 2. Resumen de las características de los pacientes con cáncer colorrectal.

TABLA 3. Resección de colon y tipo de anastomosis (n= 14)

TABLA 4. Distribución de los pacientes con cáncer de colon y recto según la clasificación de Astler-Coller.

TABLA 5. Distribución de los pacientes con cáncer de colon y recto según la clasificación TNM (n=14).

TABLA 6. Resumen de las características clínicas de los pacientes del estudio de tejido graso.

TABLA 7. Ensayos específicos de genes humanos para PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real. Todos los ensayos fueron adquiridos de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City , CA).

TABLA 8. Niveles plasmáticos de interleuquinas (IL) 2, 4, 6, 8, 10, del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), del interferón-gamma (IFN- γ), del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en sujetos no obesos y

obesos con y sin colorrectal. Los datos se representan como la media \pm desviación media estándar (n = 9). (a = estadísticamente diferentes vs no obesos; b = estadísticamente diferentes vs obesos; c = estadísticamente diferentes vs NOB-CC).

RESUMEN

RESUMEN.

PAPEL DEL VEGF EN LA ACTIVIDAD VASCULAR Y EN EL TEJIDO ADIPOSO PERITUMORAL EN EL CARCINOMA COLORRECTAL.

INTRODUCCIÓN:

Según datos de diciembre de 2014 en España el cáncer de colon es el tercero más frecuente en los hombres y el segundo en las mujeres. En términos generales, el cáncer colorrectal es el que tiene una mayor incidencia, un 15%. Un conocimiento de su fisiopatología, un diagnóstico precoz, una cirugía adecuada y un estadiaje correcto de cara al tratamiento adyuvante nos van a ayudar en el intento de mejorar su pronóstico.

La angiogénesis tumoral sigue una serie de complejos pasos consecutivos que llevan a la formación de neovasos. El endotelio ha sido considerado como un complejo órgano sensorial.

El VEGF es una proteína señalizadora implicada en la angiogénesis. Se ha demostrado que el VEGF estimula la división y la migración de células endoteliales. También es un vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular. La fosforilación reversible de proteínas juega un papel importante en la regulación de la actividad celular.

La obesidad puede definirse como un exceso de peso a expensas del tejido adiposo. La obesidad es un factor de riesgo conocido para el desarrollo de CC. El tejido adiposo es un tejido acumulador de energía y un órgano

endocrino que secreta moléculas multifuncionales que ejercen acciones pro-inflamatorias y pueden promover la iniciación y la progresión del tumor.

OBJETIVOS:

El primer objetivo de este estudio fue analizar si la fosforilación de la tirosina en las arterias que irrigan el tumor de los cánceres de colon puede modular su respuesta vascular. El segundo objetivo del presente trabajo es dar a conocer la situación inflamatoria y angiogénica en no obesos (IMC <25 kg / m²) y obesos (IMC > 30 kg / m²) en los pacientes con y sin CC, para evaluar el papel de tejido adiposo peritumoral en la inflamación inducida en el CC.

MATERIAL Y MÉTODOS:

En un primer grupo de pacientes con CC, se obtuvieron de piezas quirúrgicas las arterias mesentéricas que suministran el flujo sanguíneo tanto a los tumores colorrectales como al intestino normal. Posteriormente, se midió la tensión isométrica en un baño de órganos. También se midieron la expresión de la proteína de VEGF-A y del receptor de VEGF FLT1 mediante análisis RT-PCR y la expresión del receptor KDR del VEGF mediante Western blot.

En un segundo grupo de pacientes, se estudió la actividad inflamatoria en plasma y en la grasa visceral de piezas obtenidas en pacientes con CC y controles mediante inmunoensayo multiplex de las muestras de plasma y de PCR cuantitativa a tiempo real de las muestras de tejido adiposo.

RESULTADOS:

La inhibición de la fosforilación de la tirosina con ortovanadato produce contracción arterial, siendo ésta menor en las arterias tumorales que en las arterias de control. En las arterias tumorales se objetivó una reducción de la contracción de la noradrenalina pero no en las arterias de control y una reducción de la relajación de la bradiquinina en el control pero no en las arterias tumorales.

La expresión de la proteína de VEGF-A y del receptor de VEGF FLT1 fue similar, pero la expresión del receptor KDR del VEGF se incrementó en las arterias tumorales en comparación con las de control.

Los niveles plasmáticos de IL-6, IL-4, IL-8 y GM-CSF se incrementaron significativamente en los pacientes OB-CC. El tejido adiposo peritumoral secreta mayores cantidades de nitritos y nitratos que el tejido adiposo de control no tumoral, tanto solo como en respuesta a LPS. La secreción de nitritos y nitratos también se incrementó en explantes TF de pacientes OB-CC en comparación con los pacientes NOB-CC. La expresión del gen de la adiponectina, TNF- α , IGF-I, COX-2 y PPAR-gamma se incrementó en explantes TF de pacientes OB-CC. LPS aumentó la expresión génica de IL-6, IL-10, TNF- α , VEGF y COX-2 en el control y en explantes TF de pacientes OB-CC. Los niveles de IGF-I y PPAR-gamma mRNA fueron inhibidos en respuesta a LPS en el control y en explantes TF de pacientes NOB-CC. COX-2 y PPAR-gamma no inhibieron el aumento de LPS inducido por la liberación de nitritos y nitratos en explantes TF y adipocitos de pacientes OB-CC.

DISCUSIÓN:

Los resultados del estudio vascular ponen de manifiesto el mayor efecto vasodilatador del VEGF sobre las arterias que irrigan los tumores colorrectales en comparación con las arterias controles. Por tanto, en presencia de VEGF las arterias que irrigan el tumor aumentarían el flujo de sangre hacia el mismo mediante un mecanismo dependiente de la fosforilación del receptor. Además, hemos encontrado en este estudio que la expresión proteica de receptores de KDR está incrementada en las arterias tumorales y esto podría explicar porqué este efecto inhibitor es evidente en arterias tumorales pero no en las de control.

Los pacientes OB-CC muestran un aumento en los niveles plasmáticos de los factores pro-inflamatorios y angiogénicos producidos en parte por la grasa peritumoral. Este es el primer estudio que informa del aumento de la producción de factores proinflamatorios y angiogénicos en explantes de grasa peritumoral de pacientes OB-CC.

En resumen, el tejido adiposo peritumoral secreta factores inflamatorios que podrían influir en la creación de un microambiente que favorezca la iniciación y/o la progresión de los procesos tumorigénicos. La mayor cantidad de tejido adiposo visceral en los pacientes obesos y la mayor secreción de factores inflamatorios por este tejido suponen, por tanto, un factor de riesgo para la formación y el desarrollo de los tumores colorrectales.

CONCLUSIÓN:

La tirosina fosforilación puede producir la inhibición de la contracción en las arterias mesentéricas tumorales, lo que puede aumentar el flujo sanguíneo al tumor cuando la fosforilación de tirosina se incrementa por la estimulación de receptores de VEGF.

En pacientes OB-CC se incrementaron los niveles plasmáticos de los factores pro-inflamatorios y angiogénicos. El tejido adiposo peritumoral segrega mayor cantidad de marcadores inflamatorios que el tejido adiposo no tumoral y esta producción es mayor en OB-CC que en los pacientes NOB-CC.

SUMMARY

SUMMARY.

THE ROLE OF VEGF ON VASCULAR ACTIVITY AND IN PERITUMORAL ADIPOSE TISSUE IN COLORECTAL CARCINOMA.

INTRODUCTION

In Spain, as of December 2014, colorectal carcinoma (CC) was the third most frequent malignancy in men and the second most frequent in women. Generally speaking CC is the malignancy with the highest incidence of 15 %. Knowledge of its physiopathology, early diagnosis, well-executed surgical treatment, and correct staging oriented to adjuvant therapy, will have a role in improving its prognosis.

Tumoral angiogenesis follows a complex staged pathway resulting in neo-vessel formation. Vascular endothelium has been considered a complex sensory organ.

VEGF is a signalling protein involved in angiogenesis. It has been demonstrated that VEGF stimulates division and migration of endothelial cells; it has also a vasodilator effect and increases vascular permeability. Reversible protein phosphorylation plays an important role in cell activity regulation.

Obesity can be defined as excessive weight due to excess adipose tissue. Obesity is a known risk factor for development of CC. Adipose tissue acts both as an energy-storage and an endocrine organ, secreting multifunctional macromolecules with pro-inflammatory activity, which can promote tumor initiation and development.

PURPOSE

The first goal of this work is to analyze whether tyrosine phosphorylation in arteries irrigating CC can modulate its vascular response. The second goal is to determine the inflammatory and angiogenic status, both in non-obese (BMI<25 kg/sq m) and obese (BMI>25 kg/sq m) patients, with and without CC, to evaluate the role of peritumoral adipose tissue in the inflammation induced in the CC.

MATERIAL AND METHODS

In a first group of patients with CC, the mesenteric arteries feeding both the colorectal tumor and normal tissue were harvested from surgical resection specimens. Then vascular isometric tension was measured in an organ bath. The expression of VEGF-A protein and of the FLT1 VEGF-receptor were measured by RT-PCR analysis. The expression of the KDR VEGF-receptor was measured by Western blot.

In a second group of patients, inflammatory activity was measured in plasma and in visceral fat (from surgical specimens) obtained from CC patients and controls. Multiplex immunoassay was performed in plasma samples and real-time quantitative PCR on fat tissue samples.

RESULTS

Ortovanadate inhibition of tyrosine phosphorylation results in arterial contraction that is less marked in tumor arteries than in control ones. A reduction in noradrenalin contraction was found in tumor arteries that did not

happen in control specimens. Also a reduction in bradikinin relaxation occurred in control but not in tumor arteries.

VEGF-A protein and FLT1 VEGF-receptor expression was similar in both types of arteries but KDR VEGF-receptor expression was increased in tumor arteries as compared to controls.

IL-6, IL-4, IL-8, and GM-CSF levels were significantly increased in obese CC patients (OB-CC). Peritumoral adipose tissue secretes higher amounts of nitrates and nitrites than control, non-tumor, adipose tissue, both by itself or in response to LPS. Nitrate and nitrite secretion were also increased in tumoral fat (TF) explants from OB-CC patients relative to non-obese CC (NOB-CC) patients. Adiponectin-gene expression, TNF- α , IGF-I, COX-2 and PPAR-gamma were increased in TF explants from OB-CC patients. LPS resulted in increased genic expression of IL-6, IL-10, TNF- α , VEGF and COX-2 both in control and in OB-CC patient TF explants. Levels of IGF-I and PPAR-gamma mRNA were inhibited in response to LPS both in control and NOB-CC patient TF explants. COX-2 and PPAR-gamma did not inhibit nitrate-induced LPS increase in TF explants and adipocytes from OB-CC patients.

DISCUSSION

Results from the vascular study show the greater vasodilator effect of VEGF on arteries feeding colorectal tumors in comparison with control arteries. Consequently, the presence of VEGF would result in increased blood flow to the tumor through a mechanism dependent on receptor phosphorylation. An increased expression of KDR protein receptor in tumor arteries has also been

found in this study and it could explain why this inhibiting effect occurs in tumor arteries but not in controls.

OB-CC patients show increased plasma levels of pro-inflammatory and angiogenic factors, partly produced by peritumoral fat. This is the first study showing increased production of pro-inflammatory and angiogenic factors from peritumoral adipose tissue explants from OB-CC patients.

To summarize, peritumoral adipose tissue secretes pro-inflammatory factors which could result in a micro-environment conducive to initiation or progression of tumorigenic processes. The increased amount of visceral adipose tissue in obese patients and the higher secretion of inflammatory factors from this tissue are a risk factor for the development and growth of colorectal tumors.

CONCLUSION

Tyrosine-phosphorilation can inhibit contraction of tumor mesenteric arteries resulting in higher tumor blood flow when tyrosine-phosphorilation is increased by VEGF-receptor stimulation.

Plasma levels of pro-inflammatory and angiogenic factors were found to be elevated in OB-CC patients. Peritumoral adipose tissue secretes increased amounts of inflammatory markers than non-tumor tissue, this being higher in OB-CC than NOB-CC patients.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. IMPORTANCIA CLÍNICA DEL CÁNCER COLON Y RECTO.

En 2007 el cáncer de colon y recto era la tercera neoplasia más frecuente, con una incidencia en España de 25,8 casos/100.000 habitante/año para los varones y 15,8 casos/100.000 habitante/año para las mujeres. La mortalidad por cáncer de colon y recto era de 12,2 fallecimientos/100.000 habitante/año para los varones y de 19 fallecimientos/100.000 hababitante/año para las mujeres (Ferlay y cols., 2007).

Según datos de diciembre de 2014 de la Asociación Española Contra el Cáncer, en España el cáncer de colon es el tercero más frecuente en los hombres, por detrás del de pulmón y próstata; y el segundo en las mujeres, por detrás del de mama. En términos generales, el cáncer colorrectal es el que tiene una mayor incidencia, un 15 por ciento. Además, según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), el cáncer de colon tiene una incidencia de 32.240 personas al año en España y es el responsable de 14.700 fallecimientos.

Entre las causas del cáncer de colon se encuentran factores genéticos y ambientales; estos últimos sugeridos por su asociación con una dieta rica en grasas, ingesta de alcohol, tabaquismo, obesidad y sedentarismo. Una acumulación progresiva de alteraciones genéticas que sustentan la secuencia adenoma-carcinoma y el estudio de los síndromes de cáncer de colon hereditario muestran la importancia de los factores genéticos en el desarrollo

de esta enfermedad (Takayama y cols., 2006; Perea, 2007). Se han identificado mutaciones genéticas que afectan a genes implicados en el crecimiento y proliferación celular (oncogenes activados, por ejemplo, el oncogén CK-ras), y a genes relacionados con la regulación negativa del ciclo celular (oncogenes supresores inactivados, por ejemplo, el gen APC adenomatous polyposis coli, responsable de la poliposis adenomatosa familiar), otros genes encargados de corregir las alteraciones en la replicación del ADN (por ejemplo, la proteína p53) (Díez y cols., 2007) así como los llamados reparadores de genes (hMSH2 y hMSH1) responsables de la susceptibilidad al cáncer de colon hereditario no asociado a poliposis o síndrome de Lynch (Lynch y cols., 2004; Cubo y cols., 2000).

Aunque dos tercios de los casos se desarrollan en pacientes sin factores de riesgo, existe una cierta relación entre la presencia de cáncer de colon y recto y la historia familiar o personal de pólipos, de cáncer de colon y de enfermedad inflamatoria intestinal. Basados en esta relación, los programas de diagnóstico precoz recomiendan realizar en estas poblaciones de riesgo colonoscopia, y en personas mayores de 50 años pruebas de detección química de sangre oculta en heces y rectoscopia (Castells, 2004).

1.1.1. Diagnóstico del cáncer colorrectal.

El cáncer de colon y recto puede permanecer silente durante varios años hasta la aparición de los primeros síntomas. Clásicamente los tumores situados en la mitad derecha del colon se presentan con anemia, heces con sangre, diarrea y dolor abdominal, mientras que los que se localizan en la mitad izquierda del colon se manifiestan con alteraciones del tránsito intestinal, dolor abdominal y hemorragia digestiva baja. Sin embargo, esta sintomatología típica sólo se presenta en un 40 % de los casos. Con menos frecuencia se detecta como una masa abdominal si el tumor es de gran tamaño o como una fístula al aparato urinario, generalmente en los tumores de colon izquierdo, o al estómago en los de colon transverso. Un 25 % de los pacientes acuden al área de urgencias con sintomatología aguda, por obstrucción intestinal en un 8–30% de los casos o por perforación intestinal en un 3–9 % de los casos, bien por extensión directa a través de la pared del colon o por perforación proximal secundaria a una gran distensión del ciego por una lesión distal que obstruye y válvula ileocecal competente. En un 20 % de los pacientes la enfermedad está extendida en el momento del diagnóstico y puede aparecer hepatomegalia e ictericia si existen metástasis hepáticas o ascitis en caso de afectación peritoneal (Lledó, 2000).

El tacto rectal forma parte de la exploración física ya que permite detectar los tumores situados a 7–10 centímetros del margen anal, que suponen el 10 % de los casos y demuestra la existencia de sangre en heces.

La colonoscopia completa es la prueba de elección para el diagnóstico del cáncer de colon y recto, porque facilita la obtención de biopsias para la

confirmación histológica del diagnóstico y la detección de lesiones sincrónicas, presentes en el 5 % de los casos (Figura 1). Tiene una sensibilidad del 95 % para el diagnóstico del cáncer de colon y del 90 % para detectar pólipos mayores de un centímetro. Las complicaciones más frecuentes son la hemorragia, que ocurre en tres de cada 1000 casos, y la perforación, en uno de cada 1000 casos. Si la colonoscopia es incompleta, se recomienda realizar un enema opaco de doble contraste asociado a una rectoscopia. El enema opaco de doble contraste tiene una sensibilidad del 65–95 % para detectar lesiones mayores de 1 centímetro (Figura 2). La ecografía a través del ano y la resonancia magnética son útiles para precisar el nivel de invasión tumoral de la pared en las neoplasias de recto.

El estudio de extensión de la enfermedad consiste en un TAC toraco-abdomino-pélvico (Figuras 3 y 4) para identificar metástasis a distancia afectación peritoneal o ganglionar.

La determinación del antígeno carcinoembrionario es útil para el seguimiento de la enfermedad y para la detección precoz de recurrencias (García Aguilar, 2005).

Recientemente, la colonoscopia virtual, basada en la tomografía axial computarizada helicoidal y combinando las imágenes en tres dimensiones, se ha desarrollado como procedimiento de diagnóstico precoz para la detección del tumor primario con una sensibilidad mayor del 90 % para pólipos mayores de un centímetro (Ferruchi, 2001).

El PET-TAC es útil en el seguimiento en la evaluación de recidivas y progresión a distancia posttratamiento.

1.1.2. Vías de diseminación del cáncer colorrectal.

Las vías de diseminación del cáncer colon y recto son tres: por invasión directa a órganos vecinos, por diseminación sanguínea y por diseminación linfática. La diseminación a distancia del cáncer colon depende de la localización del tumor primario. Generalmente los tumores situados en colon y recto superior metastatizan por vía portal en el hígado, desde donde se extienden a otros órganos; los tumores situados en el recto distal drenan por las venas hemorroidales inferiores a las hipogástricas y cava inferior por lo que suelen metastatizar directamente a los pulmones. Se encuentran metástasis en el momento del diagnóstico en el 25 % de los pacientes y se localizan con mayor frecuencia en ganglios linfáticos regionales, hígado, pulmón, hueso, peritoneo y cerebro.

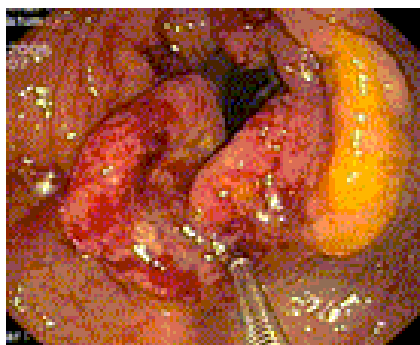


FIGURA 1. Colonoscopia con cáncer de colon



FIGURA 2. Enema opaco con neoplasia de sigma

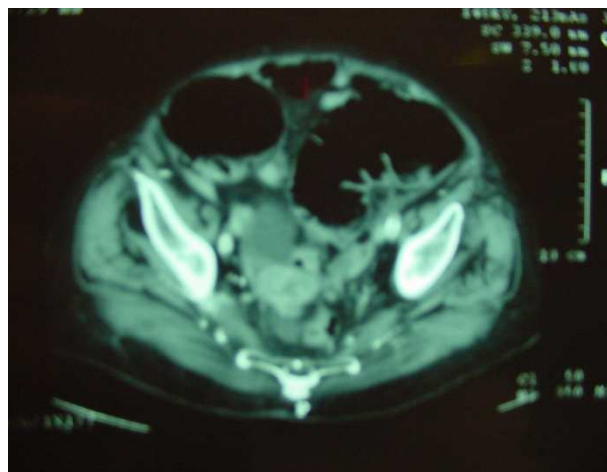


FIGURA 3. Tomografía axial computarizada con neoplasia de recto

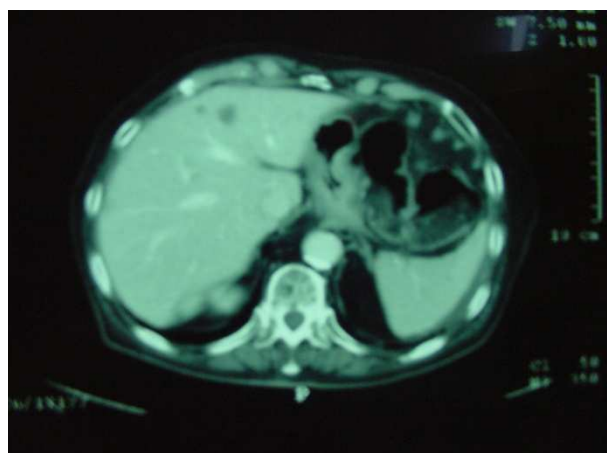


FIGURA 4. Tomografía axial computarizada con metástasis hepáticas en el lóbulo derecho

1.1.3. Clasificación y estadios del cáncer colorrectal.

Para estimar el pronóstico y seleccionar el tratamiento más adecuado se utilizan clasificaciones basadas en pruebas radiológicas, hallazgos intraoperatorios y estudios histológicos de la pieza resecada que tipifican los tumores según el grado de invasión de la pared del colon y la presencia de metástasis ganglionares.

La primera clasificación fue descrita por Dukes en 1932 (Dukes, 1932), es la más sencilla y contempla tres estadios:

- Estadio A: tumor localizado en la pared rectal
- Estadio B: tumor que invade los tejidos situados alrededor del recto
- Estadio C: invasión de ganglios linfáticos regionales

La clasificación de Astler-Coller (Astler-Coller, 1954) define los siguientes estadios:

- Estadio A: tumor limitado a la capa submucosa
- Estadio B1: tumor limitado a la capa muscular
- Estadio B2: tumor que invade toda la pared del colon
- Estadio C1: B1 con invasión ganglionar
- Estadio C2: B2 con invasión ganglionar

En 1974, se agrega una modificación en la que se valora la invasión de órganos vecinos y aparecen dos estadios más:

- Estadio B3: invasión de órganos vecinos
- Estadio C3: invasión de órganos vecinos y de ganglios linfáticos

La clasificación tumor-nódulo-metástasis (TNM) descrita por la UICC (International Union Against Cancer) en 1987 añade la importancia del número de ganglios linfáticos infiltrados en el pronóstico. La última revisión a esta clasificación se realizó en 2010 (TNM7. AJCC 2010):

T

Tx – Tumor primario no evaluables

T0 – No evidencia de tumor primario

Tis – Carcinoma in situ: tumor intraepitelial sin invasión de la lámina propia.

T1 – Tumor que invade la submucosa.

T2 – Tumor que invade la muscular propia

T3 – Tumor que penetra la muscular propia hasta el tejido pericórrrectal*

T4a – Tumor que invade el peritoneo visceral*, **

T4b – Tumor que invade estructuras u órganos adyacentes*, **

N

Nx – Ganglios linfáticos no evaluables.

N0 – No metástasis a ganglios linfáticos regionales. Se debe usar pN0 si todos los ganglios linfáticos examinados fueron negativos para metástasis, independiente del número de ganglios resecados.

N1 – Metástasis de uno a tres ganglios linfáticos regionales

N1a – Metástasis a un ganglios linfático regional

N1b – Metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales

N1c – Depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio, o tejido no peritonizado pericólico o perirrectal, sin compromiso ganglios región

N2 – Metástasis de tres o más ganglios linfáticos regionales

N2a - Metástasis de 3 a 6 ganglios linfáticos regionales

N2b – Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales.

M

M0 – No metástasis a distancia

M1 – Metástasis a distancia

M1a – Metástasis confinada a un solo sitio u órgano.

M1b – Metástasis en más de un sitio u órgano.

Estadíos

Estadío 0 – Tis N0 M0

Estadío I – T1 N0 M0; T2 N0 M0

Estadío IIA – T3 N0 M0

Estadíos IIB – T4a N0 M0

Estadío IIIA – T1-T2 N1/N1c M0; T1 N2a M0

Estadío IIIB – T3-T4a N1/N1c M0; T2-T3 N2a M0; T1-T2 N2b M0

Estadío IIIC – T4a N2a M0; T3-T4a N2b M0; T4b N1-N2 M0

Estadío IVa – Cualquier T Cualquier N M1a

Estadío IVb – Cualquier T Cualquier N M1b

* Se utiliza las letras V y L para denotar la presencia o ausencia de compromiso vascular o linfático, respectivamente. De igual forma la presencia o ausencia de invasión perineural se establece con PN.

** La invasión directa en T4 incluye el compromiso de otros órganos u otros segmentos del colon o recto como resultado de la extensión directa a través de la serosa y confirmada por patología. Para cánceres de ubicación retroperitoneal o subperitoneal, la invasión directa de otros órganos o estructuras por extensión más allá de la muscular propia como invasión de la pared posterior en colon descendente que comprometa el riñón izquierdo o la pared abdominal, o en cáncer de recto con invasión de la próstata, vesículas seminales, cérvix o vagina. Si hay compromiso macroscópico de un órgano vecino se clasifica cT4b. Si en la patología NO se evidencia compromiso del órgano adyacente, se clasifica como pT1-T4a, según el caso.

La clasificación TNM puede basarse en la evaluación clínica y radiológica obtenida antes del tratamiento (cTNM), o en el análisis anatomopatológico postquirúrgico (pTNM) y contempla también las modificaciones introducidas por el tratamiento coadyuvante preoperatorio (yTNM). Del mismo modo se añade el prefijo r a la clasificación TNM (rTNM) en los casos que han recaído tras un periodo libre de enfermedad. La estadificación anatomopatológica requiere una descripción adecuada de los hallazgos operatorios. Esta clasificación no incluye sarcomas, linfomas ni carcinoides. (AJCC Cancer Staging Manual, séptima edición (2010) publicado por Springer-Verlag New York).

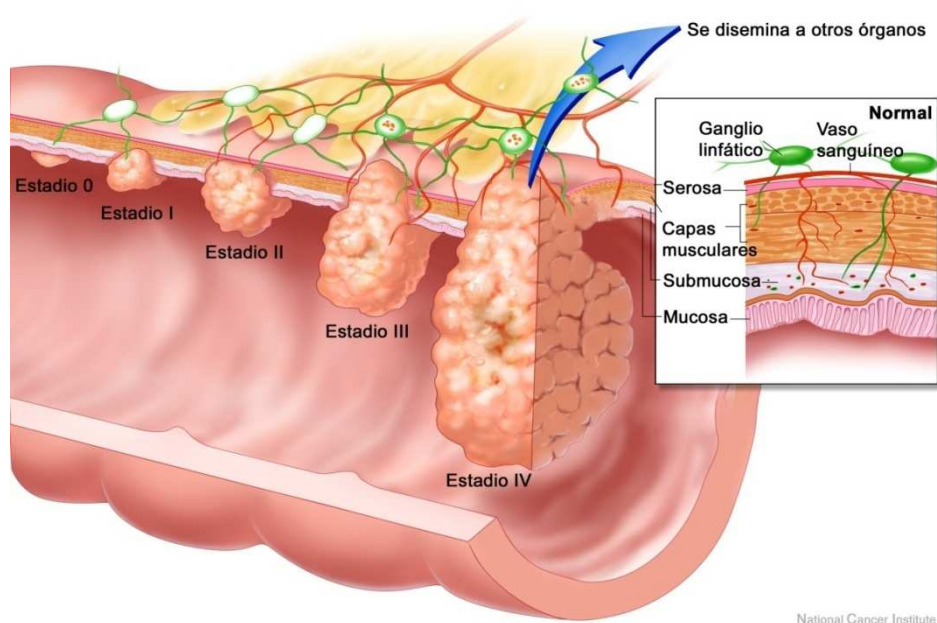


FIGURA 5. Clasificación TNM del cáncer de colon y recto. Tomado del National Cancer Institute <http://www.cancer.gov/>.

1.1.4. Pronóstico y tasas de supervivencia.

La utilidad de estas clasificaciones consiste en que permiten realizar estudios comparativos para evaluar el pronóstico y la supervivencia a los 5 años. A continuación, se reflejan las diferencias en la supervivencia a los 5 años según los estadios tumorales (Hida y cols., 2005).

TABLA 1. Tasas de supervivencia a 5 años

T1	97 %	N0	98 %
T2	90 %	N1	74 %
T3	78 %	N2	51 %
T4	38 %	N3	30 %

1.1.5. Tratamiento quirúrgico del cáncer colorrectal.

El tratamiento adecuado para el control local de la enfermedad es la resección del colon donde se sitúe el tumor, con el pedículo vascular y los ganglios linfáticos correspondientes.

Los pacientes que son intervenidos quirúrgicamente de cáncer de colon y recto deben firmar un consentimiento informado en el que se expliquen los riesgos de la operación y la posibilidad de estoma. En cirugía programada la mortalidad durante el periodo posoperatorio es menor del 5 %, el porcentaje de fístula en la anastomosis menor del 4 % y el porcentaje de infección de la herida quirúrgica menor del 10 %. Aproximadamente, un 50 % de los pacientes desarrollan complicaciones urinarias y trastornos sexuales (Lledó, 2000).

Según la localización del tumor se distinguen los siguientes tipos de intervención quirúrgica:

- Colectomía derecha (Figuras 6 y 7): resección del ciego, colon ascendente y ángulo hepático del colon junto con los últimos 10-15 centímetros de íleon terminal. Se liga la arteria cólica derecha en el origen de la arteria mesentérica superior.
- Resección de colon transverso (Figura 8): resección del colon transverso con ligadura de la arteria cólica media.
- Colectomía izquierda (Figura 9): resección segmentaria del colon izquierdo con ligadura de la arteria cólica superior izquierda.
- Resección de sigma (Figura 10): resección del sigma con ligadura de la arteria mesentérica inferior en su origen por debajo de la salida de la arteria cólica superior izquierda.

- Colectomía subtotal: resección del colon derecho, transverso, izquierdo y parte del sigma.
- Colectomía total: resección del colon derecho, transverso, izquierdo y del sigma.

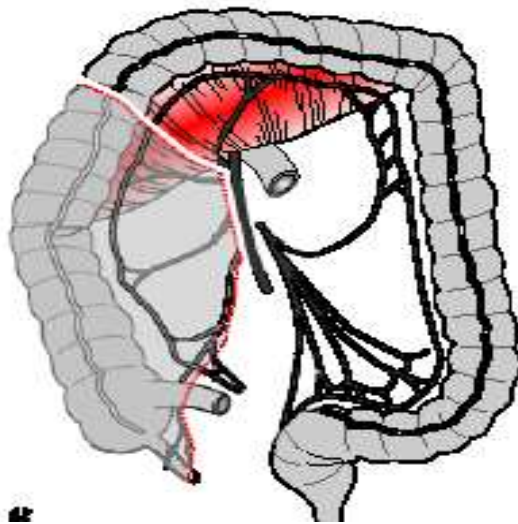


FIGURA 6. Colectomía derecha. Tomado de Lasser P, Elías D. Generalidades sobre la cirugía de exéresis de cánceres cólicos. En: Enciclopedia Médico-Quirúrgica. Elsevier, 1993

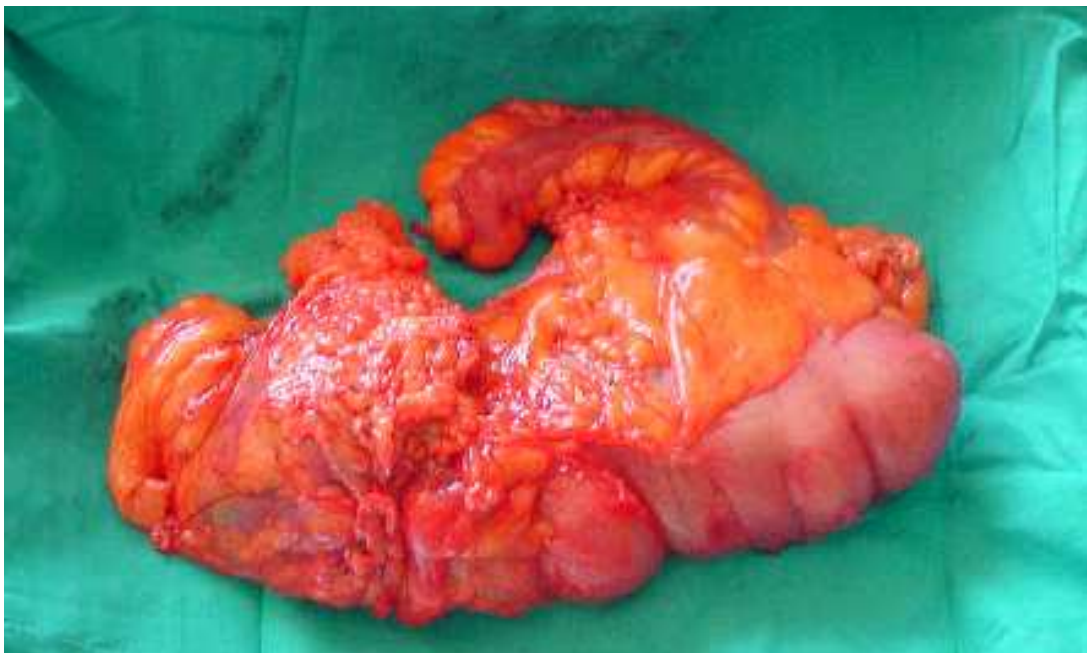


FIGURA 7. Pieza de colectomía derecha con cáncer de colon derecho

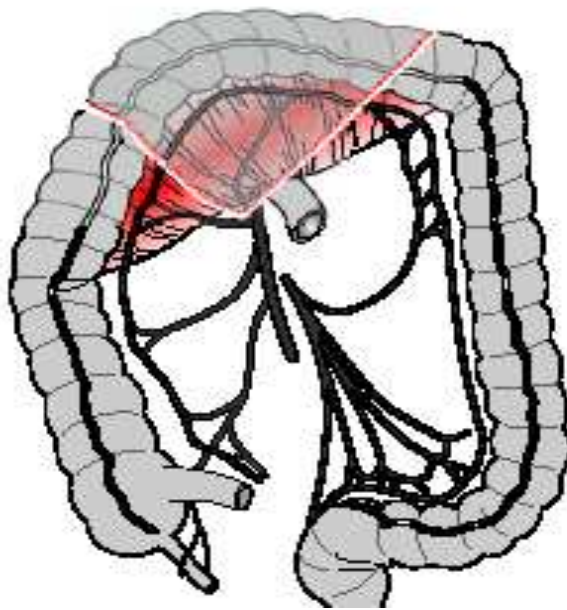


FIGURA 8. Resección de colon transverso. Tomado de Lasser P, Elias D. Generalidades sobre la cirugía de exéresis de cánceres cólicos. En: Enciclopedia Médico-Quirúrgica. Elsevier, 1993

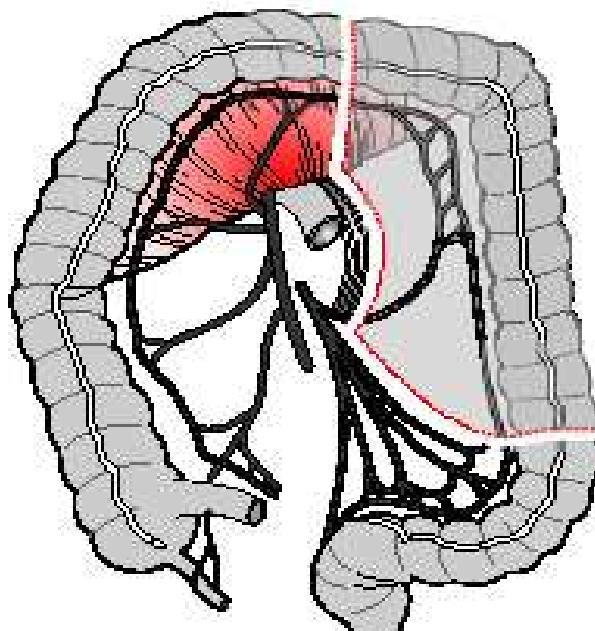


FIGURA 9. Colectomía izquierda. Tomado de Lasser P, Elias D. Generalidades sobre la cirugía de exéresis de cánceres cólicos. En: Enciclopedia Médico-Quirúrgica. Elsevier, 1993

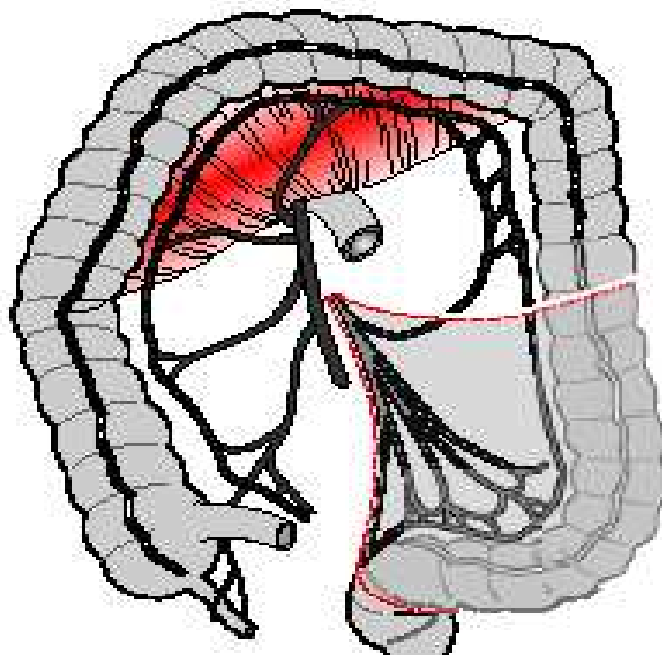


FIGURA 10. Resección de sigma. Tomado de Lasser P, Elias D. Generalidades sobre la cirugía de exéresis de cánceres cólicos. En: Enciclopedia Médico-Quirúrgica. Elsevier, 1993

Las posibilidades del tratamiento quirúrgico para el cáncer de recto varían desde resecciones locales si el tumor es menor de 3 centímetros, no invade la capa submucosa e histológicamente está bien diferenciado, a resecciones anteriores bajas (Figura 11) y amputaciones abdominoperineales, cuando el margen distal de seguridad de tumor de 2 centímetros implica la resección de los esfínteres anales. En caso de anastomosis muy próximas al esfínter es recomendable realizar un estoma de protección para disminuir el riesgo de fístula en la anastomosis por problemas isquémicos.

La continuidad del tránsito intestinal se establece mediante anastomosis término-terminales, término-laterales o latero-laterales (Figuras 12 y 13). Se pueden realizar de forma manual o mecánica en función del calibre de los segmentos que se anastomosan y de las preferencias del cirujano, ya

que no existen diferencias significativas en cuanto a la aparición de complicaciones entre estas dos posibilidades.

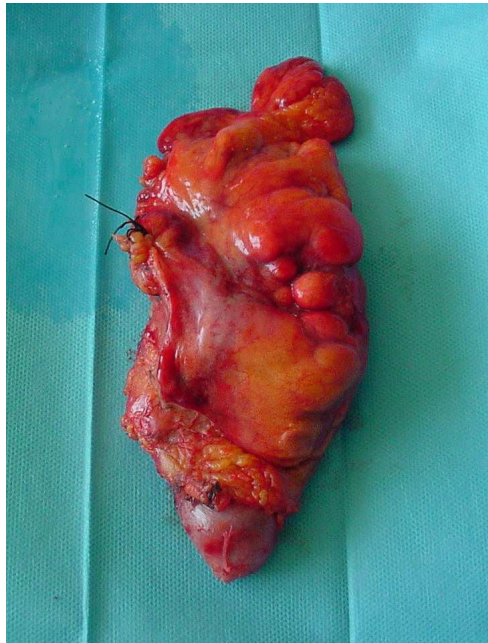


FIGURA 11. Pieza de resección anterior baja por cáncer de recto



FIGURA 12. Anastomosis término-terminal

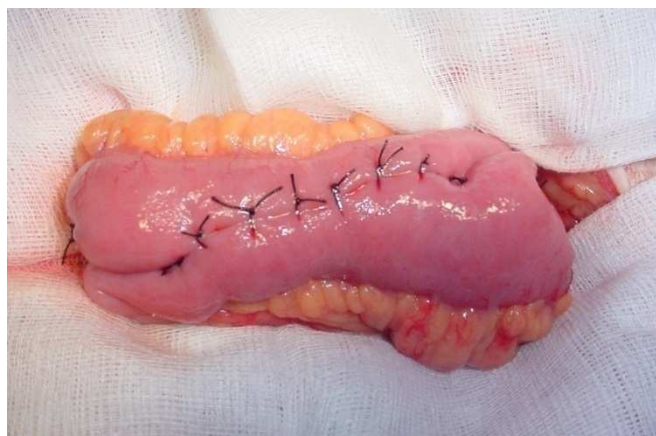


FIGURA 13. Anastomosis latero-lateral

Se considera que los márgenes de resección de tejido sano de 5 centímetros proximal y 2 centímetros distal al tumor son suficientes para evitar la recurrencia local porque se sabe que la extensión por la pared de los carcinomas de colon por vía linfática bajo la mucosa es inferior a 4 centímetros (OncoSur, 2007).

Para disminuir la diseminación del cáncer durante la intervención quirúrgica se ha defendido el gesto quirúrgico de ligar previamente los pedículos vasculares antes de cualquier manipulación del tumor. Sin embargo, no se ha demostrado que esta técnica implique ventajas oncológicas (Wiggers T, 1998).

La diseminación ganglionar del tumor se produce por proximidad anatómica. Los ganglios linfáticos invadidos son sucesivamente los pericólicos, en contacto con la arcada circundante; los intermedios, en el mesocolon y, los pediculares, en el origen de los principales troncos arteriales. La disección ganglionar debe incluir al menos 10–15 ganglios linfáticos para

permitir al anatomopatólogo establecer un pronóstico según el número de ganglios infiltrados y su localización.

Actualmente, la vía laparoscópica presenta los mismos resultados oncológicos que la vía abierta.

Además, estamos presenciando el desarrollo de las técnicas robóticas, de las intervenciones a través de orificios naturales, de la microcirugía transanal y de la cirugía transanal mínimamente invasiva, las cuales auguran un futuro apasionante en las opciones quirúrgicas frente al carcinoma colorrectal.

1.2. ANATOMÍA DE LAS ARTERIAS DEL COLON Y RECTO.

1.2.1. Arterias que irrigan el colon.

El colon está irrigado por ramas de las arterias mesentéricas superior e inferior. Cada rama de las arterias mesentéricas se bifurca en las proximidades del colon, y las dos ramas de bifurcación se anastomosan con las arterias vecinas. De esta manera, se forma un arco arterial a lo largo del intestino grueso llamado arteria marginal del colon (arteria marginalis coli), del que parten vasos cortos que se ramifican en las dos caras del colon. Los vasos cortos se anastomosan en la parte interna y sobre todo en el borde libre del colon.

La arteria mesentérica superior (arteria mesentérica superior) irriga el colon hasta la flexura cólica izquierda junto con el intestino delgado y parte del páncreas. Da las siguientes ramas (Figura 14): Arteria pancreático-duodenal inferior, arteria pancreática inferior o magna, arterias yeyunales e ileales, arteria cólica media, arteria cólica derecha y arteria ileocólica. Después de dar todas sus ramas, la arteria mesentérica superior se bifurca y se anastomosa con la última de las ramas ileales y con la rama ileal de la arteria ileocólica.

La arteria mesentérica inferior (arteria mesentérica inferior) irriga la parte izquierda del colon y el recto. Sus ramas son las más frecuentemente estudiadas en este trabajo. Proporciona las siguientes ramas (Figura 15): Arteria cólica izquierda, tronco de las arterias sigmoideas o arteria cólica izquierda inferior y arterias rectales superiores derecha e izquierda.

1.2.2. Arterias que irrigan el recto.

El recto está irrigado por las arterias rectales superiores, medias e inferiores. Además, la arteria sacra media puede proporcionar algunas ramas al recto desde los dos últimos agujeros sacros anteriores (Figura 16).

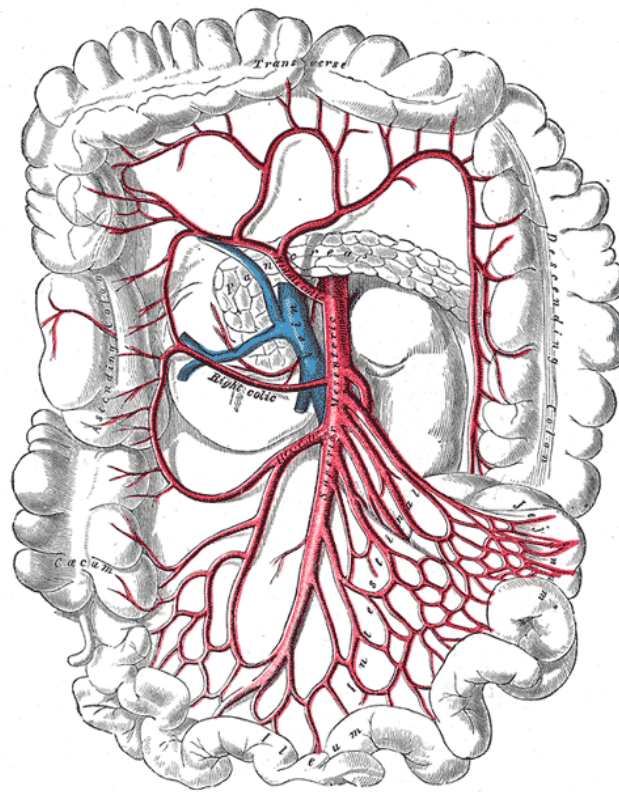


FIGURA 14. Arteria mesentérica superior y sus ramas. Tomado de <http://www.theodora.com>

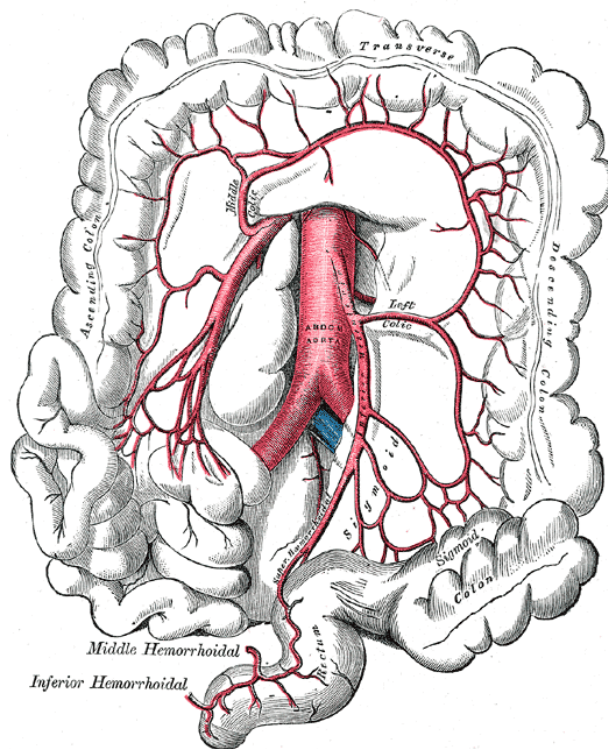


FIGURA 15. Arteria mesentérica inferior y sus ramas. Tomado de <http://www.theodora.com/>

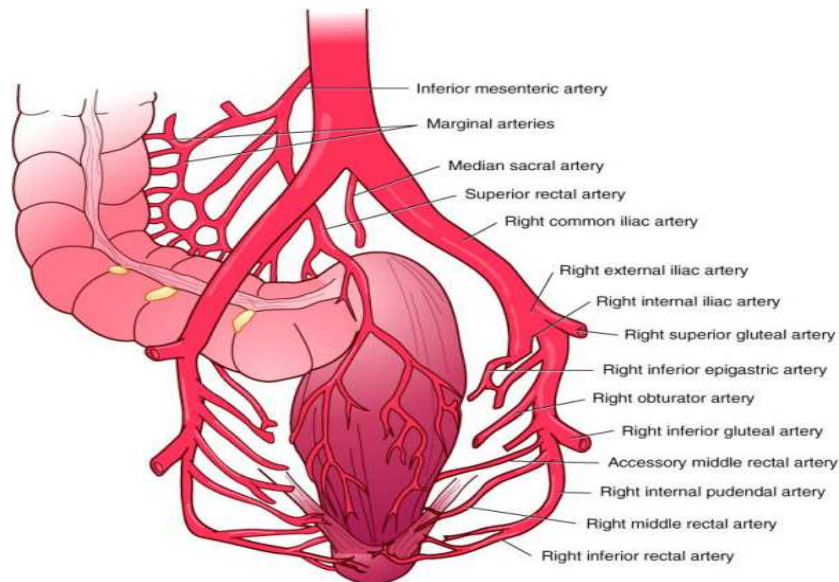


FIGURA 16. Arterias que irrigan el recto. Tomado de Gordon PH, Nivatvongs S [eds]: Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum, and Anus, 2nd ed. St. Louis, Quality Medical Publishing, 1999

1.3. ANGIOGÉNESIS TUMORAL.

La vasculogénesis comienza durante el desarrollo embrionario con la formación de los islotes sanguíneos en el mesodermo extraembrionario del saco vitelino, corion y pedículo de fijación en la tercera semana de desarrollo del feto. Alrededor del día 18 se forman los vasos sanguíneos en el mesodermo bajo la acción inductora del endodermo subyacente (Larsen, 1993). De esta manera, algunas de las células del mesodermo se diferencian en angioblastos, a partir de los cuales se desarrollan las células endoteliales planas, capaces de unirse y formar tubos largos o cordones angioblásticos, que a su vez se juntan para crear una red de plexos angioblásticos que constituyen la configuración inicial del sistema circulatorio (Sadler, 2006).

La angiogénesis es un proceso fisiológico que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes. La angiogénesis también ocurre como un proceso fisiológico en el endometrio durante el ciclo menstrual de la mujer fértil, en el ovario con la formación de la red capilar folicular, en el desarrollo de la placenta (Barillari, 1998) y en los procesos de reparación o regeneración de tejidos durante la cicatrización de las heridas (Ganong, 2006).

Cuando se ha completado el crecimiento vascular la angiogénesis ocurre como un proceso patológico que acompaña y favorece enfermedades neoplásicas y no neoplásicas, como por ejemplo la isquemia cardiaca, arterioesclerosis, hemangiomas, retinopatía diabética, artritis reumatoide, psoriasis y úlcera péptica (Carmeliet, 2000).

La angiogénesis tumoral consiste en una serie de complejos pasos consecutivos que llevan en último lugar a la formación de neovasos que suministran sangre y nutrientes a la masa tumoral (Khosravi y cols, 2008). Este proceso se produce cuando aparece un desequilibrio entre los factores pro y antiangiogénicos, a favor de los factores proangiogénicos.

En general está aceptado que ningún tumor sólido puede crecer por encima de un tamaño crítico de 1-2 mm o más de 10 millones de células sin un aporte vascular adecuado.

En la angiogénesis tumoral se dan dos fases separadas por el llamado "cambio angiogénico":

1. Durante la primera fase de crecimiento tumoral prevascular la neoplasia se desarrolla sin neovascularización debido a que los tumores secretan inhibidores del crecimiento como la angiostatina al torrente sanguíneo. Las lesiones rara vez sobrepasan los 2 – 3 mm, suelen ser asintomáticas y clínicamente indetectables. Sin embargo, predominan las micrometástasis por su capacidad de diseminación a otros órganos. El tumor primario puede permanecer en este estado de latencia durante años.
2. En la fase angiogénica de crecimiento tumoral un subgrupo de células cancerosas se desvía hacia un fenotipo angiogénico y el tumor se vasculariza. La lesión aumenta de tamaño, se convierte en detectable y sintomática, incrementa su grado de malignidad y adquiere la capacidad de crear metástasis detectables (Fenton, 2005).

Los vasos sanguíneos tumorales formados son tortuosos, dilatados y presentan un diámetro irregular con ramificaciones excesivas y fístulas arteriovenosas, lo que contribuye a que el flujo sanguíneo intratumoral sea intermitente e irregular. Su pared tiene múltiples orificios debido a que las uniones entre las células endoteliales son anchas, la membrana basal discontinua o incluso puede estar ausente y porque faltan pericitos y células del músculo liso a lo largo de la pared arterial (Figuras 17 A y B).



A



B

FIGURAS 17 A y B. Vascularización tumoral en el cáncer de colon. Tinción hematoxilina-eosina (20x y 40x). Cedido por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre

Aunque la angiogénesis proporciona al tumor capacidad de diseminación hematógica, progresión y formación de metástasis y hay investigaciones que objetivan una correlación entre la actividad angiogénica y el tamaño del tumor, tipo histológico, estadio de Dukes y grado de malignidad tumoral (Yonenaga y cols, 2005), existen otros estudios que demuestran que no hay relación entre el número de microvasos por milímetro cuadrado y la supervivencia ni el intervalo libre de enfermedad en el cáncer colorrectal (Leme

y cols, 2006). Estas diferencias se pueden explicar en parte por la heterogeneidad de la vascularización dentro del tumor con zonas avasculares de necrosis y otras muy vascularizadas. Sin embargo, a pesar de estos resultados contradictorios, se sabe que en la secuencia adenoma-carcinoma de los tumores colorrectales va aumentando la densidad de los microvasos, y es especialmente alta en el carcinoma (Choi y cols, 1998).

La regulación de la vascularización tumoral es un factor importante en el desarrollo de tumores sólidos, el flujo de sangre debe aumentar en paralelo con el crecimiento del tumor.

1.4. IMPORTANCIA DEL ENDOTELIO VASCULAR EN EL CÁNCER.

Desde el descubrimiento por Furchgott (Furchgott, 1980) del mecanismo de vasodilatación mediado por un factor relajante dependiente de endotelio, que más tarde se identificó como óxido nítrico, el endotelio ha sido considerado como un complejo órgano sensorial capaz de reaccionar a distintos estímulos y participar en numerosos procesos biológicos. Una de las aplicaciones clínicas más relevante del conocimiento del endotelio vascular es que puede ser utilizado como una auténtica diana para la terapia angiogénica ya que su área de superficie es extensa, se localiza próxima a la circulación y juega un papel importante en la angiogénesis tumoral. Las investigaciones sobre los tratamientos antitumorales basados en los mecanismos angiogénicos sugieren que la quimiorradioterapia convencional puede ser más eficaz si se dirige hacia las células endoteliales genómicamente, más estables que las propias células tumorales y con un tiempo de generación más largo (Varda-Bloom y cols., 2001).

El endotelio actúa como una unidad funcional capaz de reaccionar a estímulos nerviosos, humorales y mecánicos para regular el tono vascular mediante la secreción de sustancias vasoconstrictoras como los radicales libres, la endotelina-1 y el tromboxano A₂ y sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico, la prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (Galley y cols., 2004; Labalde, 2008; Ferrero y cols, 2008). Muchos procesos patológicos, entre ellos la cirrosis (Salcedo A, 2007) o la diabetes (García Villalón y cols., 2003) pueden modificar la respuesta vascular a estas sustancias por la disfunción endotelial que producen.

El óxido nítrico se sintetiza en el endotelio a partir de la L-arginina en una reacción catabolizada por la NO sintasa (NOS). Difunde hacia las células del músculo liso, activa a la guanilatociclasa y se produce GMP cíclico, que relaja el músculo liso. El GMPc modifica el estado de fosforilación de determinados enzimas, y además, produce la activación de la bomba de calcio en el citoplasma, inhibiendo así la contracción (Figura 18). La NOS es activada en respuesta al estiramiento y rozamiento de los vasos, por la acetilcolina y la bradiquinina, y se inactiva con análogos de la arginina como el L-NAME, sustancia que se utiliza para el estudio experimental de la participación en óxido nítrico en la respuesta vascular (Llorens y cols., 2002; Labalde y cols., 2008).

El endotelio también sintetiza prostaciclina a partir de ácido araquidónico mediante una reacción catabolizada por la ciclooxigenasa (Herman y cols., 1977). La prostaciclina inhibe la agregación plaquetaria y genera vasodilatación uniéndose a receptores acoplados a la proteína G del músculo liso, que activa a la adenilatociclasa y produce AMP cíclico. Sus acciones son opuestas a las del tromboxano A₂, sintetizado en las plaquetas a partir del mismo precursor (Figura 19). La síntesis de prostaciclina se bloquea con el meclofenamato, un inhibidor de la ciclooxigenasa.

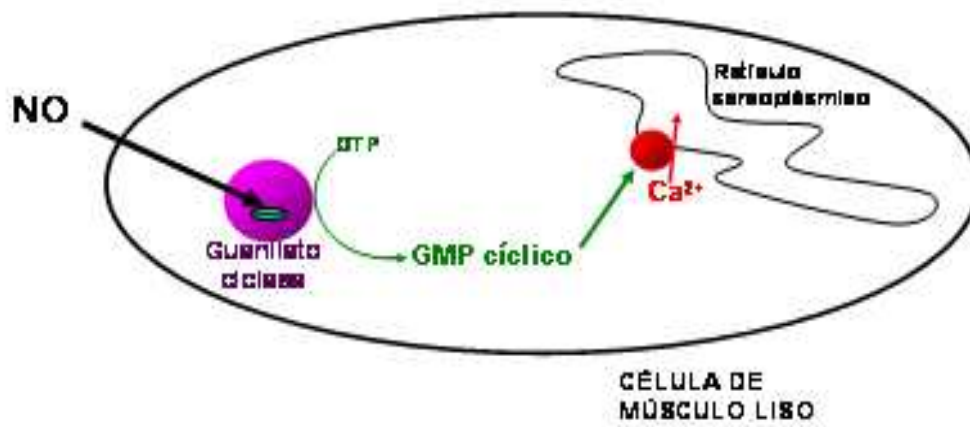


FIGURA 18. Mecanismo vasodilatador del óxido nítrico

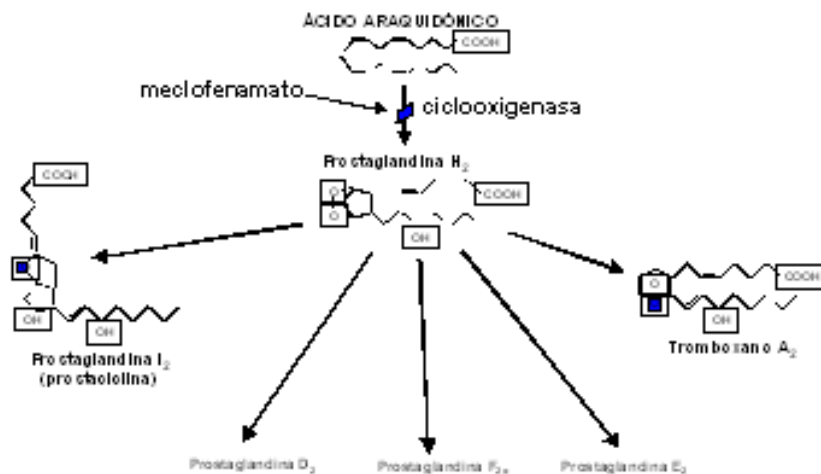


FIGURA 19. Síntesis de prostaciclina

1.5. FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF).

El VEGF es una proteína señalizadora implicada en la vasculogenesis (formación de novo del sistema circulatorio embrionario) y en la angiogenesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes). Tiene efecto sobre células endoteliales, migración de monocitos/macrófagos, neuronas, células epiteliales renales y células tumorales. VEGF es secretado por muchas células del mesénquima y del estroma. In vitro, se ha demostrado que el VEGF estimula la división y la migración de células endoteliales. El VEGF también es un vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular; originalmente recibía el nombre de factor de permeabilidad vascular (vascular permeability factor).

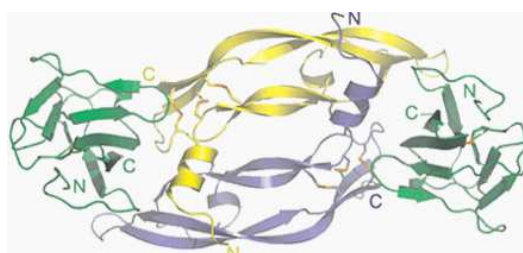
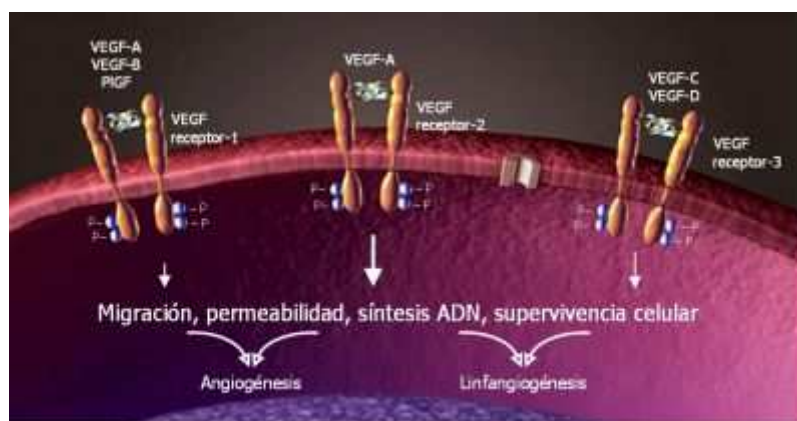


Figura 20. Molécula de VEGF. Tomada de Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev. 2004;25(4):581-611. © 2004 The Endocrine Society.

El término VEGF engloba a varias proteínas pertenecientes a dos familias, que son el resultado del empalme (splicing) alternativo del mRNA de un único gen de VEGF con 8 exones.

El factor de crecimiento dominante para el control de la angiogénesis es el VEGF-A, anteriormente llamado factor de permeabilidad vascular (VPF) (Ferrara y cols, 2003; Hicklin y Ellis, 2005; Ellis e Hicklin, 2008).

El VEGF-A es un miembro de la familia de VEGF, que también contiene VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y factor de crecimiento placentario (PlGF). Tienen efectos en diversos procesos, incluyendo linfangiogénesis, metabolismo y formación de hueso, la hematopoyesis, y la angiogénesis patológica (Carmeliet y Jain, 2011; Chung y Ferrara, 2011; Hagberg y cols, 2012; Wei y cols, 2013).



Adapted from Ferrara N. Nat Med 2003;9:669-76

Figura 21. Familia de los factores VEGF y de sus receptores. Tomado de <http://www.boloncol.com/boletin-25/nuevas-dianas-terapeuticas-en-el-tratamiento-medico-del-cancer.html>

Los diferentes subtipos de VEGF derivan de un proceso de splicing alternativo. El splicing alternativo es un mecanismo de la expresión génica diferencial que permite la selección de sitios de empalme alternativos, inclusión o exclusión de exones específicos o la retención de intrón que resulta en la producción de proteínas estructuralmente y funcionalmente distintos desde una única secuencia de codificación (Kalnina y cols, 2005; Smith, 2005). Por otra

parte, la expresión del gen VEGF está regulado transcripcionalmente por una diversidad de factores, incluyendo la hipoxia (Shweiki y cols, 1992), factores de crecimiento y citoquinas (Goad y cols, 1996; Asano-Kato y cols, 2005), hormonas (Sone y cols, 1996) (Charnock-Jones y cols, 2000), oncogenes y genes supresores de tumor (Rak y cols, 1995) (Mukhopadhyay y cols, 1995).

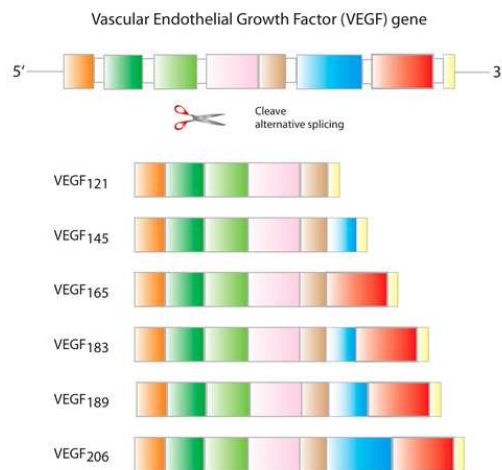


Figura 22. Formas de VEGF según splicing

El VEGF envía señales de angiogénesis al endotelio vascular a través de receptores tirosin-kinasa de alta afinidad, designados VEGFR-1 (Flt1), VEGFR-2 (Flk1 / KDR), y VEGFR-3 (Flt4). Estos receptores, que se expresan casi exclusivamente en las células endoteliales, se caracterizan por siete dominios de tipo inmunoglobulina en su región extracelular, un solo dominio transmembrana, y un dominio tirosina quinasa intracelular (Veikkola y Alitalo, 1999).

La unión ligando-receptor produce la dimerización del receptor y su activación mediante transfosforilación, aunque, en sitios, momentos e intensidad diferentes.

Los receptores de VEGF (VEGFR) se expresan en las células del endotelio tanto tumoral como no tumoral. El VEGFR-2 se estimula en tumor frente al endotelio normal. Esta expresión pleiotrópica (un solo gen es responsable de efectos fenotípicos o caracteres distintos y no relacionados) puede contribuir a la variabilidad de la señalización de VEGF en tumores.

El Neuropilin-1 (glicoproteína de superficie celular) también funciona como receptor de VEGF por vía no clásica (Neufeld y Kessler, 2008).

Existe expresión diferencial de los receptores de VEGF en las células del borde del brote (tip cells). La célula en el borde delantero de un brote angiogénico ("endotelial tip cell") es tanto fenotípica como funcionalmente distinta del resto del endotelio que comprende el resto del brote ("stalk cell"). Las células de la punta son responsables principalmente de percibir los gradientes de VEGF quimio atractivo secretadas por el tejido hipóxico. Además, las células de punta expresan altos niveles de receptores VEGFR3 y delta-Like 4 (DLL4), mientras que las células del tallo expresan altos niveles de receptores Jagged y Notch, con señales paracrinas entre las células de la punta y las del tallo que refuerzan estas diferencias fenotípicas (Tammela y cols, 2008; Suchting y Eichmann, 2009). Es concebible que la inhibición farmacológica dirigida únicamente contra células de la punta podría ofrecer beneficios anti-angiogénicos altamente selectivos.

El VEGF-A es el miembro de la familia VEGF más estudiado y farmacológicamente testado para la angiogénesis patológica. VEGF-A se

produce por un número de diferentes tipos de células (diversos linajes epiteliales, células inflamatorias y hematopoyéticas, las propias células endoteliales), actúa selectivamente sobre las células endoteliales vasculares, y es capaz de estimular la angiogénesis in vitro e in vivo. Como tal, parece desempeñar un papel activo en la inducción, mantenimiento y crecimiento de las células endoteliales vasculares. Debido a su asociación tanto con la angiogénesis normal como la anormal, se ha convertido en un objetivo atractivo para la terapia tanto proangiogénica como antiangiogénica.

Las acciones directas de VEGF-A son:

- La estimulación de la mitogénesis endotelial
- Promoción de la supervivencia endotelial por una vía fosforilación kinasa dependiente
- Control de la permeabilidad vascular (vascular permeability factor); VEGF-A es 50.000 veces más potente en la inducción de la permeabilidad vascular que la histamina (Dvorak y cols, 1995). El mecanismo de acción parece ser la fenestración del endotelio de las pequeñas vénulas y capilares a través de una Src-kinasa (Eliceiri y cols, 1999).
- Aumento de expresión del activador de plasminógeno tisular y del activador de plasminógeno uroquinasa, colagenasas y metaloproteinasas de la matriz. Todos están involucrados en la degradación de la matriz extracelular, necesaria para la migración de células endoteliales (Pepper y cols, 1990; Rifkin y cols, 1990; Tolnay y cols, 1998; Zucker y cols, 1998; Prager y cols, 2004).

- En los embriones que carecen de uno de los dos alelos de VEGF, la mutación es letal durante la gestación temprana (Ferrara y cols, 1996).
- Efecto vasodilatador: El efecto predominante del VEGF es la vasodilatación arterial, otros factores endoteliales modulan o amortiguan dicho efecto:
 - VASODILATADORES: óxido nítrico (NO), factor hiperpolarizante (EDHF), prostaciclina (PGI₂).
 - VASOCONSTRICTORES: tromboxano A₂ (TxA₂), endotelina-1 (ET-1).

La expresión de VEGF-A está regulada por la hipoxia, proporcionando un mecanismo de retroalimentación para acomodar la reducida oxigenación de los tejidos a través de la promoción de la nueva formación de vasos sanguíneos. La regulación de la expresión de VEGF-A por la hipoxia está mediada por HIF, que aumentan la transcripción del gen VEGF (Carmeliet y cols, 2000; Maxwell y cols, 2001; Kuwai y cols, 2003; Pugh y cols, 2003). Además, la hipoxia también aumenta los niveles de VEGF mediante la estabilización del ARNm VEGF (Levy y cols, 1998), así como a través de múltiples mecanismos que no implican al HIF (Mizukami y cols, 2007).

Las citoquinas tales como el EGF y TGF-beta y otras influencias (por ejemplo, la expresión de p53) también pueden aumentar la expresión de VEGF por un número de diferentes mecanismos (Takahashi y cols, 1998; Benckert y cols, 2003; Pore y cols, 2003; Ravindranath y cols, 2001; Hirata y cols, 2002). Por el contrario, las propiedades antiangiogénicas (y antitumorales) de interferón alfa pueden ser mediados, al menos en parte, por la inhibición de la

transcripción del gen VEGF (von Marschall y cols, 2003; Tosato, 2003; McCarty y cols; 2002).

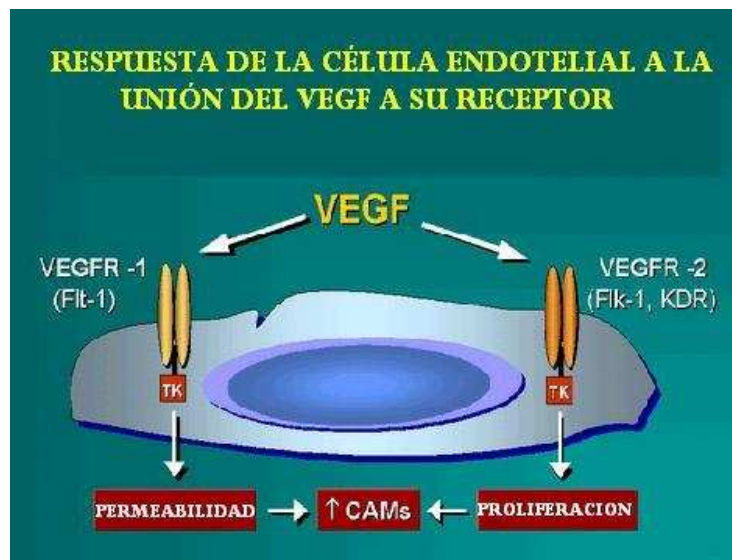


Figura 23. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) actúa en receptores en las células endoteliales con un dominio tirosín kinasa intracelular.

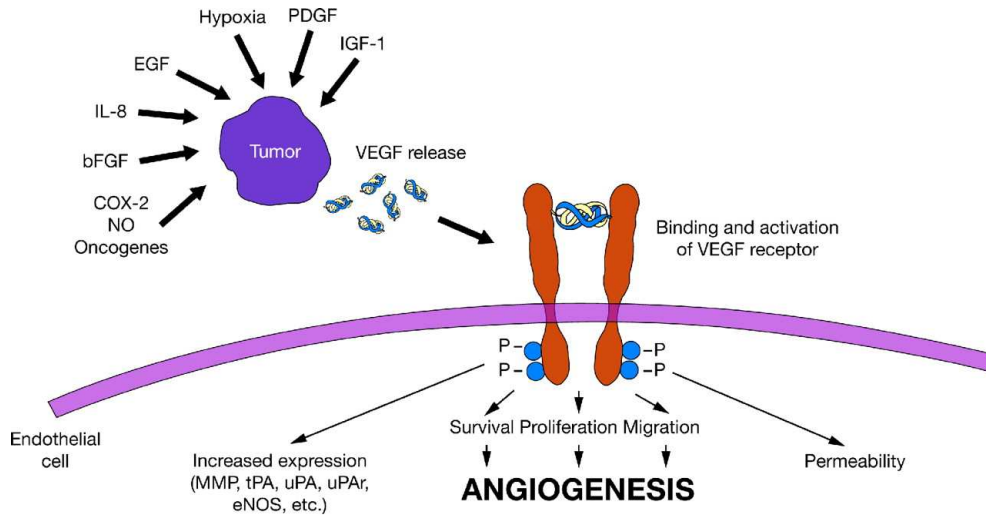


Figura 24. Las características del tumor y el medio ambiente promueven la expresión del VEGF. Tomado de mcr.aacrjournals.org on March 30, 2015. © 2007 American Association for Cancer Research

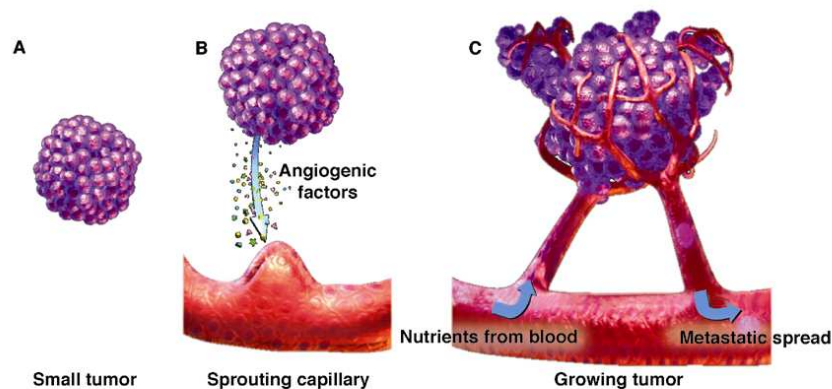


Figura 25. El tumor secreta factores de crecimiento angiogénicos , como el VEGF , para llevar a cabo la formación de nuevos vasos sanguíneos. Esta nueva vascularización permitirá que el tumor obtenga un acceso a suficiente oxígeno y nutrientes , así como una vía potencial de propagación. Tomado de <http://jcsciphile.com/uncategorized/using-cancer-to-our-advantage/>

1.6. RESPUESTA VASCULAR Y VEGF EN LAS ARTERIAS DE LOS CARCINOMAS COLORRECTALES:

Las arterias que irrigan los tumores presentan alteraciones tanto morfológicas como funcionales, que las diferencian de las arterias normales. Las arterias que irrigan tumores gástricos, de colon o de páncreas presentan una progresiva disminución de la cantidad de músculo liso en su pared al acercarse al interior del tumor, y se acompaña de deformaciones como aneurismas o regiones colapsadas (Yaegashi y cols, 1990). Esta disminución de la cantidad de músculo liso y del grosor de la capa media se ha observado también en las arterias que irrigan tumores hepatocelulares, incluso en segmentos distantes del tumor (Suzuki y cols, 1987). Asimismo, las arterias tumorales presentan alteraciones en su respuesta funcional. El aumento de presión arterial en ratas producía aumento en el flujo sanguíneo tanto en tumores trasplantados como en los inducidos químicamente, sin que se modificase el flujo en los tejidos normales, lo que indica un trastorno en la regulación vascular (Suzuki y cols, 1989). La administración intracarotídea de histamina en ratas con gliomas trasplantados producía aumento del flujo sanguíneo en el tumor y en el tejido cerebral cercano al mismo, pero no en el hemisferio cerebral contralateral (Nomura y cols, 2003). La liberación o los efectos del óxido nítrico también pueden estar alterados en los vasos sanguíneos tumorales, puesto que la administración de donantes de óxido nítrico aumentó el diámetro de las arterias tumorales y el flujo sanguíneo en adenocarcinomas de colon humano implantados en ratones, así como en adenocarcinomas mamarios de ratón, mientras que la inhibición de la síntesis de óxido nítrico disminuyó el diámetro arterial y flujo sanguíneo en ambos tipos

de tumor (Fukumura y cols, 1997). Asimismo, la inhibición de la sintetasa de óxido nítrico redujo el flujo en carcinosarcomas subcutáneos en ratas (Tozer y cols, 1997), indicando la existencia de un tono vasodilatador mediado por óxido nítrico en los vasos tumorales.

Las tirosina-quinasas son una familia de proteína-quinasas presentes en metazoos, que se asocian principalmente con los receptores de factores de crecimiento tales como VEGF, EGF y FGF (Choura M. y A. Rebai, 2011). Las tirosina-quinasas tienen importante papeles en varias funciones celulares como la diferenciación, proliferación, apoptosis, angiogénesis, y las respuestas a los neurotransmisores (Hunter T., 1998). Las tirosina-quinasas también desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de células malignas en los tumores malignos, y por lo tanto varios inhibidores de tirosina quinasas han sido añadidos a la lista de agentes antitumorales disponibles para el cáncer tratamiento (Madhusudan S. y T. S. Ganesan, 2004).

La fosforilación reversible de proteínas juega un papel importante en la regulación de la actividad celular. El patrón de fosforilación de las proteínas de una célula, está determinado por la acción de proteína quinasas (que fosforilan otras proteínas), y de proteína fosfatasas, que catalizan el proceso inverso de defosforilación. (Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., y Sudarsanam, S.; 2002).

Las proteína quinasas se caracterizan porque unen covalentemente un grupo fosfato, a partir de un ATP donador, a residuos de serina, treonina y / o tirosina, de sus sustratos. La reacción de fosfotransferencia requiere la presencia de tres sitios específicos: un sitio de unión de ATP, un dominio que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP, y un sitio para la unión del

sustrato (Hubbard, M. J., y Cohen, P., 1993). Las tirosina quinasas se dividen generalmente en dos grupos: tirosina quinasas que funcionan como receptores (RTKs) y tirosina quinasas no-receptores (no-RTKs). Las primeras, son proteínas transmembrana que contienen un dominio extracelular por el que se unen a diferentes ligandos, y un dominio intracelular, con actividad tirosina quinasa (Hubbard, S. R., y Till, J. H., 2000).

La cascada de sucesos de fosforilación resulta en amplificación y transmisión intracelular de la señal. Las proteína-quinasas poseen una amplia variedad de sustratos, tales como, proteínas estructurales, enzimas metabólicos, reguladores del ciclo celular, factores de transcripción, etc. Por ello, las rutas de transducción de señal juegan un papel crucial en la regulación de procesos celulares fundamentales como el metabolismo, la proliferación celular, la diferenciación celular, la supervivencia, la migración o la angiogénesis.

Una perturbación de las vías de transducción de señal, produce una desregulación de procesos como angiogénesis, apoptosis, migración celular, control del ciclo celular etc. y puede conducir al desarrollo de fenotipos malignos.

La desregulación de la actividad proteína quinasa, puede tener lugar por diversos mecanismos. Uno de ellos, es una reordenación genética que genere una proteína híbrida, que contenga, el dominio catalítico de la proteína quinasa unido a otra proteína, como es el caso de la fusión de la tirosina quinasa c-Abl a la región «breakpoint cluster» (BCR) en la leucemia mieloide crónica (CML). Un segundo mecanismo, que produce la disrupción de la función normal, es una mutación que hace a una quinasa constitutivamente activa, como es el

caso del oncogén c-Kit en tumores gastrointestinales. Un tercer mecanismo, implica la expresión aumentada o aberrante de la proteína quinasa o del ligando para la RTK, como por ejemplo, la amplificación de la RTK, HER-2 (ErbB2 o EGFR2) en el cáncer de mama, o la expresión aberrante del factor de crecimiento vascular (VEGF) y su receptor (VEGFR), que aumentan la angiogénesis y el crecimiento tumoral. Finalmente, la desregulación de la actividad quinasa por activación de oncogenes o pérdida de genes supresores, puede contribuir también a la tumorigénesis. Por ejemplo, la mutación de la GTPasa Ras, que conduce a desregulación de Raf, en tanto, que la pérdida de función de la proteína fosfatasa PTEN activa la serina/treonina quinasa AKT .

1.7. OBESIDAD:

La obesidad puede definirse como un exceso de peso a expensas del tejido adiposo. Es una auténtica epidemia mundial, el aumento de su porcentaje en adultos se está desarrollando de una manera geométrica. Existen en la actualidad, en nuestro medio, más personas con peso excesivo que con peso insuficiente.

La obesidad se asocia a un riesgo aumentado de padecer hipertensión arterial, diabetes mellitus, hiperlipidemia, enfermedad coronaria, cáncer, etc. Conlleva un elevado gasto sanitario que se incrementa anualmente, y en un futuro puede ser difícil su sostenimiento.

La prevalencia de obesidad ($IMC \geq 30$) pasó del 9,1% en 1993 al 15% en 2006, lo que supuso un incremento del 65%. Desde 1993 a 2006 la prevalencia de obesidad mórbida aumentó en más de un 200%, pues pasó de 1,8 a 6,1/1.000 habitantes. Por otro lado, en 1993 el 7,7% de los adultos españoles presentaban un $IMC \geq 30$ pero < 35 , y en 2006 eran ya el 11,9%, lo que supuso un incremento del 54% (Basterra-Gortari F. J. y cols., 2011). La prevalencia ha crecido en ambos sexos, especialmente en los varones, que progresivamente se han acercado a las mujeres. En Estados Unidos se han publicado estimaciones de que entre 1990 y 2000 la prevalencia de obesidad mórbida se multiplicó por 3 en varones y sólo por 2,3 en mujeres, aunque las mujeres presentaban mayor prevalencia (Freedman DS y cols., 2002). Esta importante tendencia creciente de la prevalencia de obesidad mórbida, tanto en varones como en mujeres, confirma que la obesidad mórbida forma parte principal de la epidemia de obesidad que afecta a los países occidentales (Rose G., 2001).

La fisiopatología de la obesidad es compleja y pobremente conocida. No es solamente resultado de la glotonería, sino un problema en el cual los predisponentes genéticos se interrelacionan con factores ambientales, psicológicos y metabólicos. Estudios familiares sugieren que la herencia está implicada en más del 60% de los casos, aunque los factores genéticos son insuficientes para explicar el rápido crecimiento de la incidencia de la enfermedad. La disminución de la actividad física y el incremento de la alimentación rica en grasas pueden ser responsables del resto. La obesidad secundaria a causas monofactoriales (síndrome de Cushing, origen hipotalámico, síndromes genéticos de baja incidencia, hipotiroidismo, toma de medicamentos, etc.) suponen menos del 1%.

La obesidad se clasifica atendiendo al índice de masa corporal (IMC), que es la relación del peso en kilogramos dividida por el cuadrado de la talla en metros (kg/m^2):

- Bajo Peso	IMC	< 18.5
- Normopeso	IMC	18.5-24.9
- Sobrepeso grado I	IMC	25-26.9
- Sobrepeso grado II	IMC	27-29.9
- Obesidad grado I	IMC	30-34.9
- Obesidad grado II	IMC	35-39.9
- Obesidad grado III o mórbida	IMC	40-49.9
- Obesidad supermórbida	IMC	50-59.9
- Supersuperobesidad	IMC	60-64.9
- Obesidad triple	IMC	> 65

El tratamiento médico está basado en dieta ejercicio, cambios conductuales, fármacos y balón intragástrico y fracasa en más del 95% de las ocasiones. La dieta tiene un éxito limitado a corto plazo y casi nulo a largo plazo; los obesos tienen dificultad para realizar ejercicio físico; los cambios conductuales en la ingesta son complejos y fracasan por el gran esfuerzo requerido por parte del paciente. El tratamiento farmacológico se basa en dos fármacos, sibutramina y orlistat, los resultados a corto plazo son aceptables, aunque a los 1-18 meses se vuelve a recuperar peso. El balón intragástrico consigue escasa pérdida de peso mientras está colocado y tras su retirada se vuelve a ganar peso.

La cirugía bariátrica es el único tratamiento que resulta eficaz a largo plazo (>5 años) en pacientes con obesidad mórbida, y cuando se comparan los procedimientos quirúrgicos con los no quirúrgicos se confirma que la cirugía es un tratamiento altamente coste-efectivo.

Las indicaciones fundamentales para realizar cirugía bariátrica serían un IMC mayor o igual de 40 kg/m² o en pacientes con IMC mayor igual a 35 kg/m² con comorbilidad de alto riesgo (alteraciones cardiopulmonares secundarias a la obesidad, diabetes, problemas físicos que condicionan la movilidad del paciente).

Las técnicas realizadas se dividen en restrictivas (banda gástrica ajustable, manga gástrica) y mixtas, con componente restrictivo y malabsortivo (bypass gástrico, cruce duodenal, derivación biliopancreática,...).

El aumento del número de cirugías bariátricas realizadas (Santry HP, Gillen DL, Lauderdale DS., 2005) es un buen correlato de la creciente prevalencia de obesidad mórbida (Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin

LR., 2010). Sin embargo, la gran prioridad en salud pública debería ser la prevención primaria de la obesidad en el conjunto de la población.

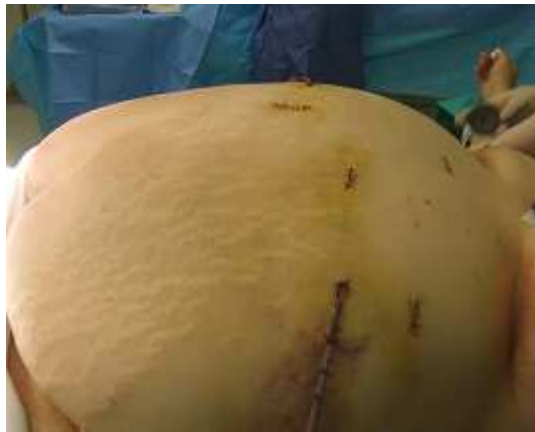


Figura 26. El aumento en el número de cirugías bariátricas es un indicador del aumento en la prevalencia de la obesidad mórbida.

1.8. CANCER COLORRECTAL Y OBESIDAD:

Como con la mayoría de los cánceres, la interacción de la genética y el medio ambiente juegan un papel importante en la carcinogénesis de colon (Win, A.K., y cols., 2012).

Hay pruebas convincentes de que entre los factores del medio ambiente encontramos la obesidad, cuya prevalencia está aumentando en las últimas décadas, especialmente en los países desarrollados, que constituye un factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer (Frezza, E.E., M.S. Wachtel, Y M. Chiriva-Internati, 2006). De hecho, el aumento de la grasa corporal y el índice de masa corporal (IMC) se asocian con un mayor riesgo de cáncer de colon, tanto en animales de experimentación (Lee, W.M., y cols., 2001) como en los seres humanos (Giovannucci, E., y cols., 1996). Por el contrario la restricción calórica, la actividad física y una dieta saludable se correlacionan negativamente con el riesgo de padecer este tipo de cáncer (Khan, N., F. Afaq, y H. Mukhtar, 2010; Mai, V., y cols., 2003)].

Los mecanismos que vinculan la obesidad y el cáncer colorrectal no se conocen, pero la obesidad asociada a la inflamación crónica es ampliamente aceptada como un factor importante en la patogénesis del cáncer de colon (Balkwill, F. y L.M. Coussens, 2004).

El tejido adiposo ya no se considera sólo un tejido acumulador de energía, sino un órgano endocrino que secreta una variedad de moléculas multifuncionales denominadas adipoquinas (Hauner, H., 2005). Algunas de estas adipoquinas, como la IL-6 y el TNF- α , ejercen acciones pro-inflamatorias

potentes y pueden promover la iniciación y la progresión del tumor (Grivennikov, S.I. y M. Karin, 2011).

En la obesidad, el tejido adiposo se expande y varias moléculas inflamatorias, tales como la MCP-1, PAI-1, IL-6, IL-1 β o TNF- α , se encuentran en mayores cantidades en el tejido (Wellen, K.E. y G.S. Hotamisligil, 2005) contribuyendo a un estado de inflamación crónica de bajo grado (Mcardle, M.A., y cols., 2013).

Macrófagos residentes en el tejido adiposo son los principales productores de citoquinas pro-inflamatorias y su número se correlaciona de manera directamente proporcional con el índice de masa corporal (Curat, C.A., y cols., 2004).

Sin embargo, se ha objetivado que los adipocitos maduros también contribuyen a la inflamación inducida por la obesidad no sólo por la liberación de una gran variedad de adipoquinas (Fain, J.N., y cols., 2004), sino también mediante la secreción de factores solubles que aumentan la diapédesis de monocitos de sangre humana a través de las células endoteliales de los capilares (Curat, C.A., y cols., 2004). La secreción en el adipocito de estos factores solubles se incrementa aún más en respuesta a estímulos inflamatorios tales como los LPS (Nakarai, H., y cols., 2012) o TNF- α (De Vergueiro Lobo, S.M., y cols., 2012).

Por lo tanto, asistimos a la creación de un entorno favorable a los tumorigénicos como resultado de un exceso de adiposidad localizado en un estado de inflamación sistémica crónica de bajo grado atribuido a la producción de estas citoquinas inflamatorias por adipocitos y las mismas células inmunes (Harvey, A.E., L.M. Lashinger, y S.D. Hursting, 2011).

Además de los marcadores inflamatorios, las células adiposas también producen factores angiogénicos tales como el VEGF (Zhang, Q.X., y cols., 1997), o como la IGF-I, factores que contribuyen tanto al crecimiento de tumores sólidos (Carmeliet, P. y R.K. Jain, 2000; Park, J., D.M. Euhus, y P.E. Scherer 2011) como para el desarrollo de la obesidad (Lijnen, H.R., 2008). De hecho se informa de que los niveles de IGF-1 sistémico, que se elevan en la obesidad, son suficientes para acelerar el crecimiento tumoral en modelos de cáncer (Hursting, S.D., y cols., 2007). En cuanto al VEGF, se informa de que entre todos los tejidos adiposos examinados en el cuerpo, el tejido adiposo visceral llega a expresar el más alto nivel de VEGF (Zhang, Q.X., y cols., 1997). Los estudios de localización han demostrado que los adipocitos son la fuente primaria de VEGF en el tejido adiposo, que puede actuar como un factor angiogénico de supervivencia para la vascularización de la grasa visceral (Cho, C.-H., y cols., 2007) y participa en la maduración y la diferenciación de los adipocitos (Lijnen, H.R., y cols., 2006). Además, las células inflamatorias del tejido adiposo y las células del estroma adiposo también contribuyen significativamente a la producción de VEGF (Rehman, J., y cols., 2005).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

Nuestra **primera hipótesis** es que, al igual que sucede con otros estímulos vasoactivos, la respuesta al VEGF podría estar alterada en las arterias que irrigan los tumores, y este conocimiento podría contribuir a comprender los mecanismos que regulan el flujo sanguíneo durante el crecimiento tumoral. Como consecuencia ello permitiría diseñar tratamientos antitumorales más eficaces.

Por ese motivo el **primer objetivo** de este proyecto es analizar el efecto del VEGF y de sus inhibidores en las arterias que irrigan tumores de colon y recto humanos, comparándolo con los efectos en arterias normales.

También, dada la estrecha relación entre la obesidad y CC, estudiaremos la actividad inflamatoria en la grasa visceral de piezas obtenidas en pacientes con carcinoma colorrectal y pacientes controles.

Nuestra **segunda hipótesis** es que un alto índice de masa corporal, acompañado de un elevado grado de adiposidad visceral en los pacientes con cáncer colorrectal podría inducir un incremento en los niveles plasmáticos de VEGF y de otros factores angiogénicos y pro-inflamatorios que podrían afectar al desarrollo y a la progresión del tumor. Esta mayor secreción de factores angiogénicos y pro-inflamatorios podría derivar, al menos en parte, del tejido adiposo visceral peritumoral.

Por consiguiente, el **segundo objetivo** de nuestro estudio es valorar la situación inflamatoria y angiogénica en pacientes no obesos (IMC <25 kg / m²) y obesos (IMC > 30 kg / m²) con y sin cáncer colorrectal, así como analizar el posible papel del tejido adiposo visceral en la secreción de factores

angiogénicos y proinflamatorios en el cáncer colorrectal. Además, entre los posibles mecanismos implicados en la secreción de factores pro-inflamatorios y angiogénicos por el tejido adiposo peritumoral examinaremos el papel de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y receptor activado por el proliferador peroxisoma gamma (PPAR-gamma) por ser dos factores que están involucrados en la iniciación y progresión del tumor y que se encuentran extremadamente sobreexpresados en los tumores de colon.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ARTERIAL:

3.1.1. Características clínicas de los pacientes de los que se obtuvieron los segmentos arteriales.

Para esta primera parte del estudio se reclutaron 14 pacientes intervenidos por carcinoma colorrectal en el Hospital 12 de Octubre de Madrid.

La edad media de los mismos fue de 72 años (rango: 45 - 83 años). La distribución por sexos fue de 8 varones y 6 mujeres. En estos pacientes y con respecto a los factores de riesgo cardiovascular, 9 eran hipertensos, 8 diabéticos y en 5 los perfiles lipídicos estaban alterados. Todos los casos de neoplasias de colon y recto habían presentado síntomas durante un período de tiempo de menos de 6 meses: de ellos 4 manifestaron pérdida de peso, 6 hemorragia digestiva baja, 6 anemia, 7 alteraciones del ritmo intestinal, 8 dolor abdominal y 3 trastornos relacionados con la defecación.

Los 14 pacientes fueron diagnosticados de adenocarcinoma colorrectal mediante el análisis anatomopatológico de las biopsias tomadas durante la colonoscopia. En 5 pacientes la lesión obstruía la luz del colon y en 8 se objetivaron pólipos asociados no malignos. La distribución de la localización de la lesión tumoral fue: 8 en el colon derecho, 2 en el colon transversal, 1 en el colon izquierdo, 1 en el sigma y 2 en el recto.

3 pacientes fueron sometidos a estudio ecográfico y en todos los casos se realizó una tomografía axial computarizada, en la que se objetivaron lesiones pulmonares en 4 casos y lesiones hepáticas en 8 casos. Con respecto

a la patología tumoral, las lesiones hepáticas objetivadas en la tomografía axial computarizada se describieron como metástasis hepáticas en 3 pacientes, en 2 como quistes hepáticos simples, en 2 como granulomas y en 1 como hemangioma; y las lesiones pulmonares se definieron como nódulos pulmonares milimétricos en todos los casos. En el estudio preoperatorio de todos los pacientes se incluyó una radiografía de tórax, con hallazgos patológicos en 4 casos, y un electrocardiograma con alteraciones en 7 casos. Con respecto a la escala de riesgo anestésico ASA (American Society of Anesthesiologists), la distribución de los pacientes fue la siguiente: 1 ASA I, 6 ASA II, 6 ASA III, 1 ASA IV. (Tabla 2).

TABLA 2. Resumen de las características de los pacientes con cáncer colorrectal.

	CÁNCER COLORRECTAL
NÚMERO DE PACIENTES	14
EDAD MEDIA (años)	72
SEXO (V:M)	8:6
HIPERTENSIÓN ARTERIAL	9
ALTERACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO	5
DIABETES MELLITUS	8
FUMADOR	3
RADIOGRAFÍA TÓRAX PATOLÓGICA	4
ECG PATOLÓGICO	7
RIESGO ANESTÉSICO:ASA I	1
RIESGO ANESTÉSICO: ASA II	6
RIESGO ANESTÉSICO: ASA III	6
RIESGO ANESTÉSICO: ASA IV	1

Las intervenciones quirúrgicas fueron las siguientes: 1 colectomía total, 8 hemicolectomías derechas, 1 resección segmentaria de colon transverso, 1 hemicolectomía izquierdas, 1 resección de sigma, 2 resecciones anteriores. Se realizaron 6 anastomosis término-terminales, 1 término-lateral y 7 latero-laterales; 12 fueron manuales con sutura biplano y 2 mecánicas con la grapadora Curved Intraluminal Stapler CDH. El tipo de anastomosis realizado en cada caso de resección de colon y recto se describe en la Tabla 3.

TABLA 3. Resección de colon y tipo de anastomosis (n= 14)

	ANASTS LATERO- LATERAL	ANASTS TÉRMINO - LATERAL	ANASTS TÉRMINO - TERMINAL	ANASTS MECÁNICA	ANASTS MANUAL
COLON TOTAL	0	0	1	0	1
COLON DERECHO	7	0	1	0	8
COLON TRANSVERSO	0	0	1	0	1
COLON IZQUIERDO	0	1	0	0	1
SIGMA	0	0	1	1	0
RESECCIÓN ANTERIOR	0	0	2	1	1

En el estudio anatomopatológico de la pieza obtenida se utilizaron las clasificaciones de Astler-Coller y TNM para describir los hallazgos histológicos (Tabla 4 y 5).

TABLA 4. Distribución de los pacientes con cáncer de colon y recto según la clasificación de Astler-Coller.

	NÚMERO DE PACIENTES
ESTADIO A	1
ESTADIO B1	2
ESTADIO B2	7
ESTADIO B3	1
ESTADIO C1	0
ESTADIO C2	3
ESTADIO C3	0

TABLA 5. Distribución de los pacientes con cáncer de colon y recto según la clasificación TNM (n=14).

T tumor	NÚMERO DE PACIENTES	N ganglios	NÚMERO DE PACIENTES	M <i>metástasis</i>	NÚMERO DE PACIENTES
Tis	1	N 0	10	M 0	11
T 1	1	N 1	2	M 1	3
T 2	1	N 2	2		
T 3	7	N 3	0		
T 4	4				

En todos los casos los bordes de resección estaban libres de enfermedad. La media del número total de ganglios linfáticos aislados incluidos en la pieza de resección fue de 19,6 (rango: 0 - 55). La estancia media hospitalaria de los pacientes incluidos en este estudio fue de 21,4 días (rango: 8 - 76). La estancia media postoperatoria fue de 17,8 días.

3.1.2. Recolección de las arterias mesentéricas humanas.

En este estudio, se han utilizado arterias (0,7 a 1,5 mm de diámetro externo) de 14 pacientes diagnosticados de tumor colorrectal (edad media: 72 ± 4 años, 8 hombres y 6 mujeres). El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital 12 de Octubre y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio antes de la cirugía.

Se diseccionaron arterias que suministraban el flujo sanguíneo tanto al tumor como al colon normal tras la cirugía de cada paciente siguiendo el modelo de estudios previos (Ferrero y cols., 2007) y se congelaron en hielo seco para realizar técnicas RT-PCR y de Western blot, o se mantuvieron en solución salina isotónica fría para estudiar la respuesta vascular in vitro.

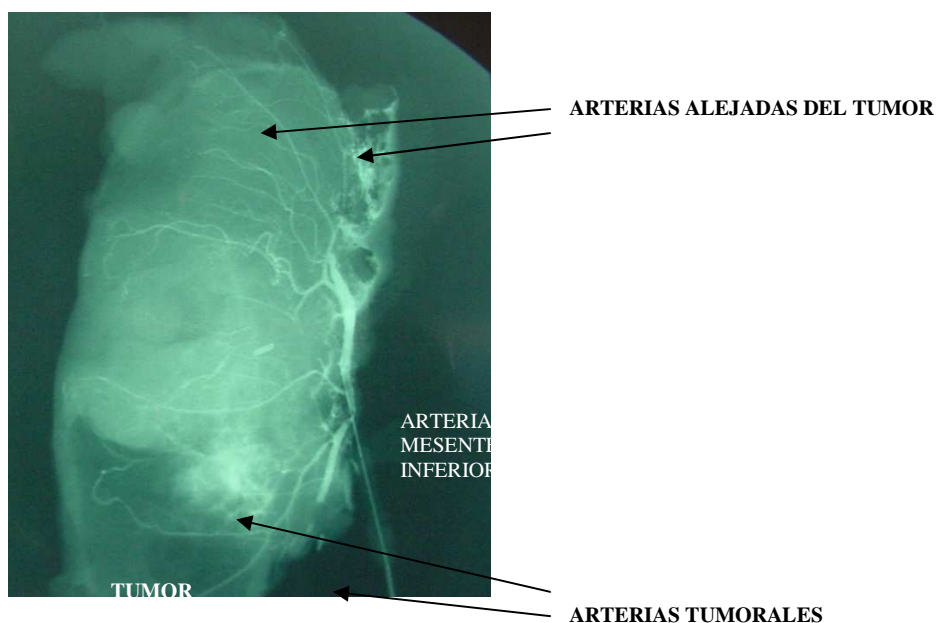


Figura 27. Arteriografía de una pieza de resección anterior baja por cáncer de recto mediante la canalización de la arteria mesentérica inferior. Arterias tumorales y alejadas del tumor.

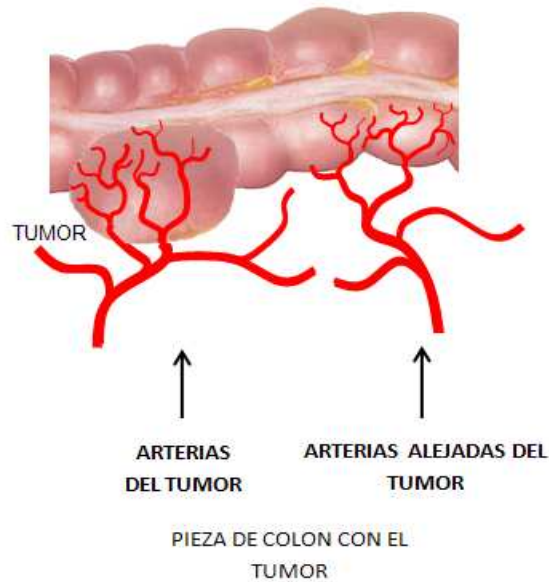


Figura 28. Representación esquemática del tipo de arterias utilizadas en el estudio.

Las muestras obtenidas de tejido arterial eran introducidas en solución salina fría y, posteriormente, transportadas inmediatamente desde los quirófanos del Hospital Universitario 12 de Octubre hasta los laboratorios del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid dentro de un termo con hielo.



Figura 29. Disección de las arterias tras extirpar la pieza quirúrgica.



Figura 30. Muestras preparadas para el estudio.

3.1.3. Registro de la respuesta vascular.

El tiempo medio transcurrido desde la extracción de las muestras hasta la utilización de las arterias fue de menos de veinticuatro horas.

En el laboratorio las arterias se depositaron en una placa de Petri con suero fisiológico, colocada sobre hielo. En esta placa y con ayuda de una lente binocular Zeiss Stemi SR se seleccionaron arterias mesentéricas de aproximadamente 1 mm de diámetro y se cortaron en segmentos de 2 mm de longitud para montarlas en un sistema de registro de la tensión isométrica en un baño de órganos.



Figura 31. Disección arterial bajo el microscopio óptico en el laboratorio de Fisiología.



Figura 32. Segmentos arteriales.

Cada segmento se preparó para el registro de la tensión isométrica en un baño de órganos de 4 ml que contiene solución de Krebs-Henseleit modificado a 37° C (mM): NaCl, 115; KCl, 4,6; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄, 1,2; CaCl₂, 2,5; NaHCO₃, 25; glucosa, 11. La solución se equilibró con 95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono a un pH de 7.3 a 7.4. Dos alambres de acero fino (100 micras de diámetro) se pasaron a través de la luz del segmento vascular, un alambre se fijó a la pared del baño de órganos mientras que el otro se conectó a un medidor de tensión isométrica para su grabación (Universal Transducción celular UC3 y Statham microescala accesorios UL5, Statham Instruments, Inc.). Esta disposición permite aplicar una tensión pasiva en un plano perpendicular al eje largo del cilindro vascular. Los cambios en la fuerza isométrica se registraron en un ordenador Macintosh mediante software Chart v 3.6/s y un sistema de adquisición de datos MacLab/8e (ADInstruments). Se aplicó una tensión pasiva óptima de 1 g a los segmentos vasculares y, a

continuación, se les permitió equilibrarse durante 60-90 min. Antes de comenzar el experimento, los segmentos vasculares fueron estimulados con cloruro potasio (50 mM) para determinar la contractilidad de músculo liso, y los segmentos que se contrajeron menos 0,5 g se descartaron.



Figura 33. Baño Arterial de Krebs-Henseleit

Para analizar el efecto directo de la fosforilación de la tirosina en el tono vascular de las arterias mesentéricas, se registraron curvas dosis-respuesta acumulativas para ortovanadato de sodio (10^{-4} - 10^{-2} M) en los segmentos vasculares de las arterias que aportan flujo al tumor (tumoral) y de los que lo suministran al colon normal (control) en los mismos pacientes.

Este efecto fue también medido en presencia del inhibidor de la tirosina quinasa, genisteína (10^{-4} M) para analizar si la respuesta se debió a la de la fosforilación tirosina. Para estudiar el efecto de la fosforilación de la tirosina después del tratamiento con ortovanadato en respuesta a un estímulo vasoconstrictor o vasodilatador se utilizó noradrenalina (10^{-9} - 10^{-4} M) y

bradiquinina dependiente del endotelio (10^{-9} - 10^{-5} M) (10^{-3} M), respectivamente, en el control y en las arterias tumorales.

El ortovanadato fue añadido al baño de órganos 30 min antes de la curvas dosis-respuesta a la noradrenalina o la bradiquinina, y antes del registro de la relajación a la bradiquinina, se precontrajeron las arterias con U46619 (10^{-9} - 10^{-8} M) para llegar a un tono contráctil de alrededor de 3-3,5 g. La contracción en respuesta al ortovanadato de sodio y a la noradrenalina se expresó como el porcentaje de la máxima contracción producida por el potasio (50 mM), mientras la relajación en respuesta a bradiquinina se expresó como el porcentaje del tono activo que se logra con U46619. En cada curva de dosis-respuesta, el pD₂ se calculó como el logaritmo negativo de la concentración que produce el 50% de la respuesta máxima por interpolación geométrica.

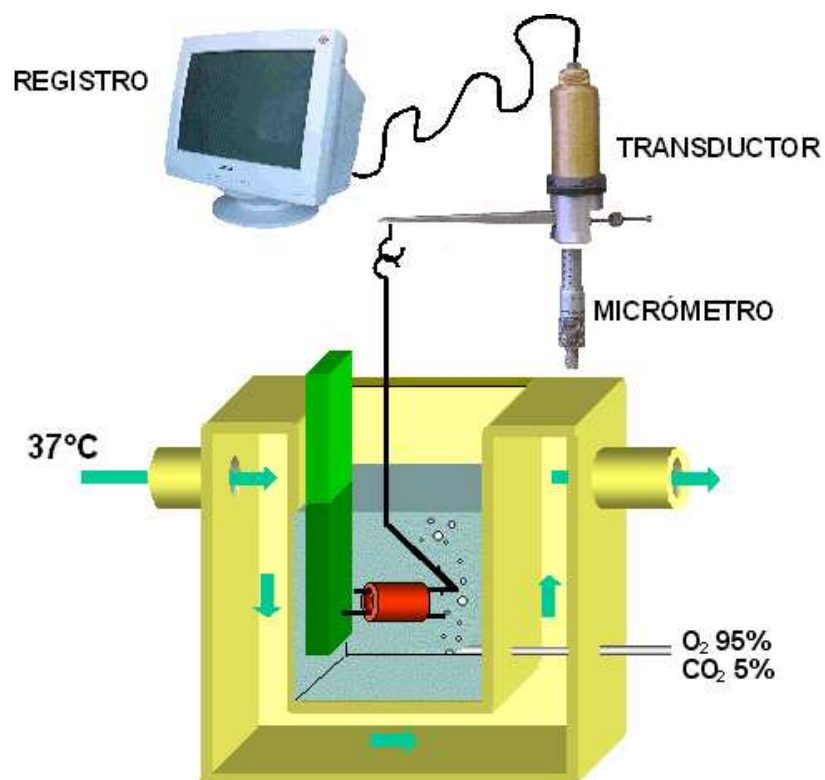


Figura 34. Representación esquemática del montaje experimental utilizado para el registro de la tensión isométrica

3.1.4. Aislamiento de RNA y análisis RT- PCR.

El ARN total fue aislado de segmentos vasculares congelados mediante el uso del reactivo de aislamiento TriPure (Roche, Grupo SA), según el protocolo sugerido por el fabricante. La concentración y la integridad del ARN se determinaron utilizando RNA 6000 Nano LabChip en un bioanalizador Agilent 2100. La transcripción inversa se realizó con High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems). Los cebadores usados para la amplificación de cDNA se obtuvieron de TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, inventoried assays) para VEGF-A (Hs03929005 m1), VEGFR1 (FLT1) (Hs01052961 m1), VEGFR2 (KDR) (Hs00911700 m1), y GAPDH (endogenous control 4352934E). La amplificación del ADNc diana se realizó utilizando 7900HT Fast Real-Time PCR System siguiendo las condiciones estandarizadas de ciclo térmico: 50° C durante 2 min, 90° C durante 10 min , seguido por 40 ciclos de 95° C durante 15 segundos y 60° C durante 1 min. Todas las reacciones de RT - PCR se realizaron por duplicado. El ciclo umbral (Ct) se determinó tanto para el gen diana como para GAPDH en cada muestra, y la cuantificación relativa de ambos genes se determinó con el método 2-DDCT (Sellitti D.F. y cols., 2007).

3.1.5. Análisis Western blot.

La expresión de VEGF-A, KDR, y FLT1 en muestras vasculares se midió mediante Western blot. Los tejidos vasculares eran homogeneizados en un tampón de lisis (en mM): 50 Tris-HCl, 125 NaCl, 1 EDTA, EGTA 1, 1% Nonidet (NP-40) que contiene 5% del total de una mini-tab de coctel inhibidor de la proteasa (Roche Biochemicals) y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4° C. La concentración de proteína se determinó usando un método modificado de Lowry (Peterson G. L., 1977). A continuación, se obtuvieron 50 microgramos de proteína en SDS-PAGE al 12% y se transfirieron electroforéticamente a una membrana de PVDF utilizando celdas Mini Trans-Blot (BioRad laboratorios, CA, USA). Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después las membranas se incubaron durante toda la noche a 4° C con anticuerpos monoclonales (Sigma) diluidos 1:1000). Posteriormente las membranas se incubaron con una dilución 1: 2500 de anticuerpos secundarios con peroxidasa conjugada de rábano (Sigma-Aldrich). Los blots fueron visualizados usando el kit ImmunoStar HRP Sustrato (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las densidades relativas de las bandas fueron analizados utilizando Image Gauge v 4.0, proteínas Fujifilm. Las proteínas se normalizaron con la tubulina. Los anticuerpos utilizados son monoclonal anti-VEGF-A, monoclonal contra el VEGF-receptor 1 (FLT1), receptor monoclonal anti- receptor VEGF 2 (KDR) diluido a (1: 1.000) y policlonal anti-tubulina (1: 1000) (Sigma Aldrich).

3.1.6. Análisis estadístico.

Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media. Las respuestas ortovanadato, la noradrenalina, y la bradiquinina en segmentos vasculares del tumor y del control, tratados y no tratados con genisteína u ortovanadato, se compararon mediante dos vías ANOVA seguido por prueba de Bonferroni para determinar qué comparaciones fueron estadísticamente significativas. La expresión génica y proteica de VEGF, FLT1, y KDR en arterias control y tumorales se compararon mediante t de Student pareada.

3.1.7. Fármacos utilizados.

Los compuestos utilizados fueron (todos de Sigma) ortovanadato de sodio (Na_3VO_4); genisteína (5,7-dihidroxi- 3- (4 - hidroxifenil) 4H - benzopiran-4 -ona, 4,5,7 - trihidroxi - isoflavona); L- noradrenalina ((1R) -4- (2- amino - 1 - hidroxietil) -1,2 - bencenodiol); acetato de bradicinina, U46619 (9,11- didesoxi - 11 α , 9 α - epoximetano prostaglandina F2a).

3.2. PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INFLAMATORIA DE LA GRASA VISCERAL.

3.2.1. Características clínicas de los pacientes en los que se han obtenido las muestras.

El estudio fue evaluado y aprobado por el Comité Ético del Hospital 12 de Octubre responsable de la investigación con sujetos humanos. Todos los participantes fueron informados por escrito y se les pidió firmar un consentimiento informado para ser parte del estudio.

Se reclutó un grupo de pacientes diferentes al estudio arterial.

18 pacientes con cáncer colorrectal y 18 pacientes sin cáncer de colon (controles) fueron incluidos en el estudio. Todos los pacientes fueron estudiados por los cirujanos del Servicio de Cirugía General y Digestivo Sección B del Hospital 12 de Octubre de Madrid (España). Ambos grupos, control y carcinoma colorrectal, fueron clasificados en función de su índice de masa corporal en no obesos ($IMC < 25 \text{ kg / m}^2$) y obesos ($IMC > 30 \text{ kg / m}^2$).

En función de la presencia o no de tumor colorrectal y del índice de masa corporal los pacientes que formaron parte del estudio se distribuyeron en: no obesos, obesos, no obesos con cáncer colorrectal (NOB-CC) y obesos con cáncer colorrectal (OB-CC).

La edad media de los pacientes no obesos (voluntarios sanos) era de 37.3 años, de los obesos (cirugía bariátrica) de 43.1 años, de los NOB-CC de 69.7 años y de los OB-CC de 71.5 años.

En cada grupo, el IMC medio en kg/m^2 era de 22.6, 46.3, 24.3 y 33, respectivamente.

En cuanto al sexo, se distribuían al 50% los controles no obesos, en el grupo de obesos las mujeres representaban el 73%, en el grupo NOB-CC estas suponían el 66% y en el de OB-CC un 55.5%.

Presentaban diabetes mellitus el 20 % de los pacientes obesos, el 33% de los pacientes NOB-CC y el 33% de los pacientes OB-CC. Obviamente ningún de los pacientes no obesos sanos la presentaba.

El 44 % de los pacientes OB-CC presentaba alteración de la función renal en algún grado, no apreciándose este hecho en los pacientes del resto de los grupos.

El 6.6 % de los pacientes obesos y el 11.1 % de los NOB-CC presentaban enfermedad hepática reseñable, no así en el resto de los grupos.

La mitad de los pacientes obesos a los que se practicó cirugía bariátrica presentaban síndrome de apnea hipopnea. Otras comorbilidades presentes en los 4 grupos eran hipertensión arterial, dislipemia, asma o hipertrofia benigna de próstata.

En cuanto al estadiaje en los pacientes oncológicos en el grupo NOB-CC presentaban un T1 el 11.1 % de los pacientes, un T2 el 22.2 % y un T3 el 66%, mientras que en el grupo OB-CC fue de 14.2 %, 14.2 % y 71.4 %, respectivamente.

4 pacientes del grupo NOB-CC y 3 del grupo OB-CC presentaban afectación ganglionar en el estudio anatomopatológico de la pieza quirúrgica.

1 paciente de cada grupo (NOB-CC y OB-CC) presentaba metástasis a distancia en el momento de la cirugía.

TABLA 6. Resumen de las características clínicas de los pacientes del estudio de tejido graso. (ns = no significativo; a = estadísticamente diferentes vs no obesos; b = estadísticamente diferentes vs obesos; c = estadísticamente diferentes vs NOB-CC).

	NOB	OB	CC	OB-CC	p
Edad (años)	37,3 ± 5,2	43,1 ± 2,9	69,7 ± 3,6^{ab}	71,5 ± 3^{ab}	p=0,0025
IMC(kg/m ²)	22,6 ± 3,2	46 ± 1,1^{acd}	24,3 ± 2,2	33 ± 1,07^{ac}	P= 0,019
% ♀	50	73,3	66,6	55,5	ns(p=0,3868)
% ♂	50	26,3	33,3	44,4	ns(p=0,3868)
% Diabetes	0	20	33,3	33,3	ns(p=0,2773)
% enfermedad renal	0	0	0	44,4^{abc}	ns(p=0,0037)
% enfermedad hepática	0	6,6	11,1	0	ns(p=0,7711)
% T2	-	-	22,2	14,2	
% T3	-	-	66,6	71,4	
% T4	-	-	0	0	

3.2.2. Recogida de muestra de plasma.

Las muestras de plasma de sujetos no obesos sin carcinoma colorrectal se obtuvieron de voluntarios sanos y el plasma y muestras de tejido adiposo de los sujetos obesos sin cáncer colorrectal fueron obtenidas de pacientes obesos sometidos a cirugía bariátrica. Las muestras de plasma y el tejido adiposo de pacientes con carcinoma colorrectal se obtuvieron de pacientes sometidos a resección de un carcinoma de colon.

Para todos los pacientes, las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa después de un periodo de ayuno durante la noche. La sangre se recogió en tubos que contenían EDTA como anticoagulante, y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos para obtener el plasma. Las muestras de plasma fueron inmediatamente congeladas a -80 °C para su posterior análisis.

3.2.3. Recogida de muestras de tejido adiposo visceral.

En los pacientes obesos sin cáncer de colon se obtuvieron de la zona peri-gástrica durante la cirugía bariátrica.

En los pacientes con carcinoma colorrectal se obtuvo de la zona mesentérica durante la cirugía:

- Grasa peritumoral (TF): tejido adiposo mesentérico diseccionado desde un lugar que rodea el tumor.
- Grasa no tumoral (NTF): tejido adiposo de un lugar no afectado por el tumor.

3.2.4. Inmunoensayo multiplex de las muestras de plasma:

El análisis de los niveles plasmáticos de interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10), de granulocitos-macrófagos factor estimulante de colonias (GM-CSF), interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se llevó a cabo en un kit de ensayo Bio-Plex Pro Assay de 9 paneles para citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento de Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.).

El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Después del bloqueo de los pocillos de la placa con tampón de ensayo éstos se lavaron usando un colector de vacío. A continuación se incubaron 25 μ l de plasma por pocillo junto con una mezcla de esferas marcadas con un tipo de fluorescencia diferente para cada antígeno con su correspondiente anticuerpo durante 18 horas a 4°C. Posteriormente se añadieron 25 μ l de anticuerpo conjugado a biotina. Después de una incubación durante 30 min a temperatura ambiente, las muestras se incubaron durante 30 min con 50 μ l de estreptavidina conjugada con ficoeritrina. Después del lavado, las muestras se volvieron a suspender y un mínimo de 50 cuentas por parámetro se analizaron en el sistema de matriz de suspensión Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España). Los datos brutos (media intensidad de fluorescencia (MFI)) se analizaron utilizando el software Administrador de Bio-Plex 4.1 (Bio-Rad Laboratories). Todas las muestras se ejecutaron dentro del mismo ensayo por duplicado.

3.2.5. Cultivos de explantes de tejido adiposo visceral:

Tras la disección las muestras de tejido adiposo se colocaron en una solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las piezas se limpiaron cuidadosamente retirando los vasos y el tejido blando adyacente. Después de la preparación, las muestras de tejido adiposo se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en 1 ml de medio en placas de cultivo de 24 pocillos durante 24 h a 37 °C en un 95% de O₂ y 5% incubadora de CO₂. El medio consistía en Dulbeccos Modified Eagle's Medium Ham's 1:1 mezcla; DMEM: F-12 / glutamina; Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 100 U / ml de penicilina y 100 mg / ml de estreptomicina (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Los explantes (aprox. 250 mg) se incubaron con diferentes tratamientos: LPS (100 ng / ml), el inhibidor de la COX-2 meloxicam (10^{-9} M)) y el antagonista de PPAR-gamma Bis-fenol-A-diglycidyl éter (BADGE 10^{-9} M). Todos los fármacos se adquirieron de Sigma Aldrich (España). Tras una incubación de 24 horas con los diferentes tratamientos los explantes y el medio de cultivo se almacenaron durante 24 horas los sobrenadantes a - 80 °C. Asimismo se midió el peso húmedo del tejido graso restante con el fin de expresar la nitritos y nitratos secreción como M / 100 mg de grasa.

3.2.6. Aislamiento y cultivo de adipocitos maduros.

Las muestras de tejido graso se disecaron para el aislamiento de adipocitos maduros y se colocan en PBS. Los vasos sanguíneos visibles se retiraron cuidadosamente. Posteriormente, piezas de tejido finamente cortadas fueron maceradas en una solución que contenía PBS, 1 mg / ml de colagenasa tipo I (Worthington corporación bioquímicos, Freehold, NJ, EE.UU.) y CaCl_2 (1‰) durante 90 minutos en una estufa a 37°C con una agitación de 100 rpm / min. Tras la digestión el tejido se filtró a través de una malla de algodón (250 micras), las células se lavaron cuatro veces con DMEM:F12 y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min. De la capa superior se tomaron 50 µl de adipocitos maduros (aproximadamente 105 células) y se inocularon en 1 ml de DMEM:F12 en placas de cultivo de 24 pocillos. Las células se incubaron en un incubador de CO₂ al 5 % a 37°C con o sin 100 ng / ml de LPS. 24 horas más tarde se recogió el medio de cultivo de cada pocillo y se congeló a -20°C hasta la medición de nitritos y nitratos.

3.2.7. Determinación de nitritos y nitratos en el medio de cultivo.

Las concentraciones de nitritos y nitratos en el medio de cultivo se midieron mediante un método modificado de ensayo de Griess, descrito por Miranda y cols. en 2001.

Se añadieron 100 µl de cloruro de vanadio a 100 µl de medio de cultivo en placa de 96 pocillos. Inmediatamente después se añadió reactivo de Griess (1:1 mezcla de 1% sulfanilamida y 0,1% de dihidrocloruro de naftiletilendiamina) a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. La absorbancia se midió a 540 nm.

La concentración de nitritos y nitratos se calculó utilizando una curva estándar de NaNO₂ y se expresó en µM.

3.2.8. ARN preparación y purificación.

El ARN total se extrajo a partir de tejido adiposo visceral de acuerdo con el protocolo Tri-reactivo (Chomczynski, P., 1993).

A continuación, se sintetizó cDNA a partir 1 µg de ARN total usando un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

3.2.9. PCR cuantitativa en tiempo real.

La expresión de los genes de adiponectina, IL-6, IL-10, TNF- α , IGF-I, VEGF, COX-2 y PPAR-gamma se analizó en explantes viscerales de tejido adiposo peritumoral por PCR cuantitativa en tiempo real.

La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó usando kits de ensayo-on-demand (Applied Biosystems) para cada gen (Tabla 7).

Tabla 7. Ensayos específicos de genes humanos para PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real. Todos los ensayos fueron adquiridos de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City , CA).

Gen	Referencia
<i>PPAR-γ</i>	Hs_01115513
<i>COX-2</i>	Hs_00153133
<i>TNF-α</i>	Hs_01113624
<i>Adiponectina</i>	Hs_00605917
<i>VEGF</i>	Hs_00900055
<i>IGF-1</i>	Hs_01547656
<i>HPRT-1</i>	Hs_02800695
<i>IL-6</i>	Hs_00985639
<i>IL-10</i>	Hs_00961622

TaqMan PCR Universal Master Mix (Applied Biosystems) se utilizó para la amplificación de acuerdo con el protocolo del fabricante en una máquina Step One (Applied Biosystems).

Los valores se normalizaron utilizando el gen de la fosforibosiltransferasa hipoxantina-guanina (HPRT).

De acuerdo con las directrices del fabricante, se utilizó el método $\Delta\Delta CT$ para determinar los niveles relativos de expresión. Las estadísticas se realizaron utilizando los valores $\Delta\Delta CT$ (Livak, K.J. y Schmittgen T.D, 2001)

3.2.10. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el software Graph-Pad 5.0.

Los niveles plasmáticos de citoquinas pro - inflamatorias y factores angiogénicos fueron analizados por ANOVA de dos vías con el cáncer y la obesidad como factores, seguido por la prueba post-hoc de Bonferroni (n = 9 pacientes / grupo).

En experimentos in vitro se llevaron a cabo estos en cuatro pacientes de cada grupo experimental, tanto para explantes de tejido adiposo como para adipocitos maduros. Al menos 6 explantes o 6 pocillos con adipocitos maduros de cada tipo de grasa se incubaron con o sin LPS. La expresión de genes de adipocitokina a partir de explantes y las concentraciones de nitritos y nitratos de ambos explantes y adipocitos maduros eran analizar por ANOVA de una vía seguida por el test post-hoc Bonferroni. Los valores se expresan como la media (\pm error estándar de la media) y un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo

RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1. ESTUDIO VASCULAR:

4.1.1. Respuesta de las arterias al ortovanadato sódico en presencia/ausencia de genisteína.

La estimulación con cloruro de potasio (50 mM) produjo una contracción similar en arterias tumorales ($3,27 \pm 0,22$ g) y arterias controles ($3,18 \pm 0,28$ g). El ortovanadato de sodio indujo vasoconstricción de una manera dosis-dependiente tanto en arterias tumorales ($n=10$) como en arterias controles ($n=9$), si bien dicha contracción fue menor en las arterias tumorales que en las controles. (Figura 1; $p<0.05$)).

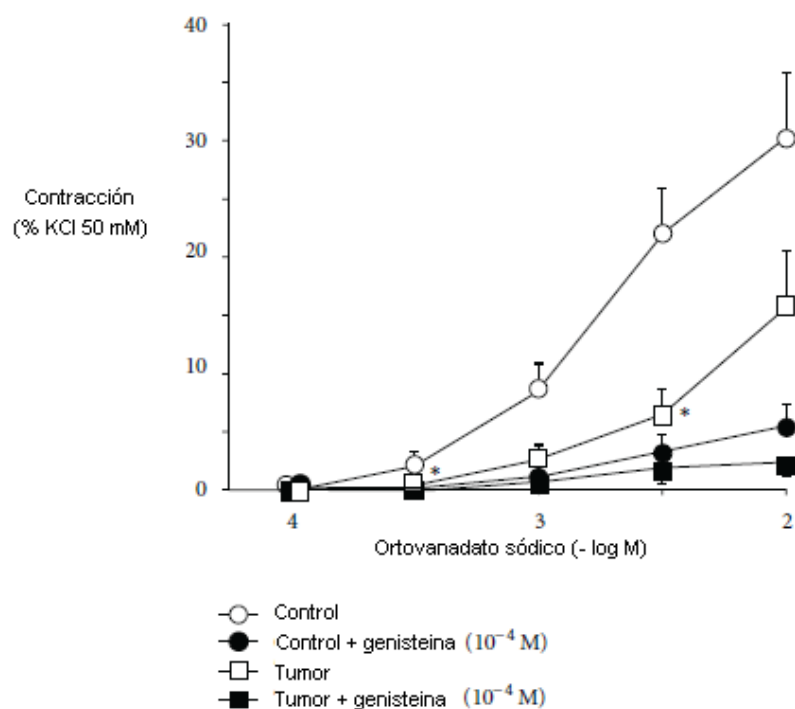


Figura 35. La contracción en respuesta al ortovanadato sódico (10^{-4} - 10^{-2} M) de las arterias mesentéricas que suministran sangre a los tumores colorrectales (tumor, $n = 10$) y aquellas que suministran al colon normal (control, $n = 9$), en ausencia o en presencia de genisteína (10^{-4} M, $n = 4$). Los valores representan la media \pm error estándar de la media. * $P < 0.05$ estadísticamente significativa frente control.

Esta contracción con ortovanadato se redujo con la genisteína, tanto en segmentos arteriales tumorales como en los controles (n = 4 en ambos grupos).

4.1.2 Respuestas de las arterias a la noradrenalina en presencia/ausencia de ortovanadato sódico.

La noradrenalina también produjo una contracción dosis dependiente, que era similar en las arterias controles y en las arterias tumorales ($PD_2 = 6,20 \pm 0,07$, $n = 6$ frente a $6,52 \pm 0,23$, $n = 6$, respectivamente) (Figura 36). En las arterias controles, el pretratamiento con ortovanadato de sodio no modificó la contracción a la noradrenalina ($pD_2 = 6,13 \pm 0,35$, $n = 7$). Sin embargo, la contracción a la noradrenalina en los segmentos de arterias tumorales tratados con ortovanadato fue menor ($pD_2 = 5,68 \pm 0,12$, $n = 6$, $p < 0,05$) que en los segmentos de arterias tumorales no tratados.

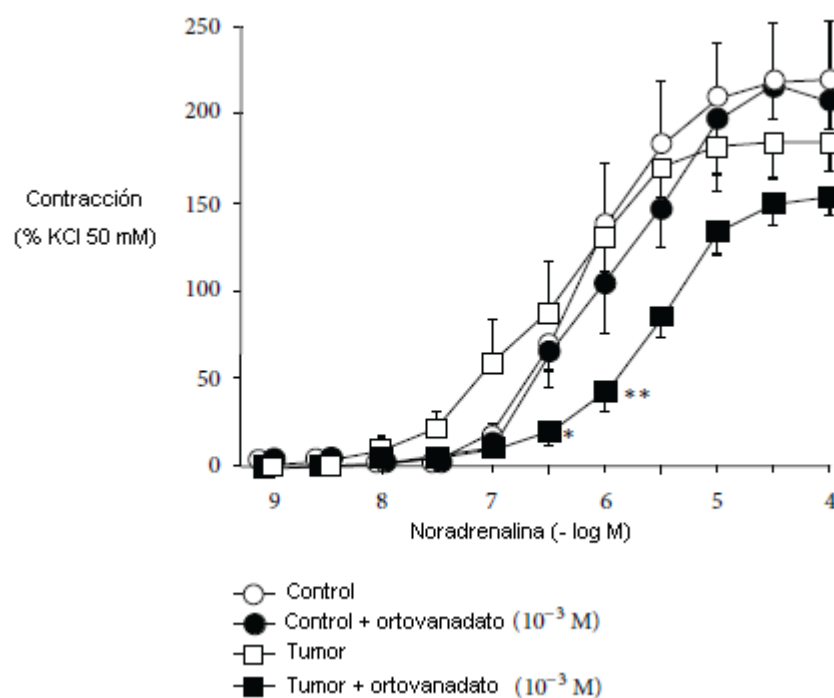


Figura 36. La contracción en respuesta a la noradrenalina (10^{-9} - 10^{-4} M) de las arterias mesentéricas que suministran sangre a los tumores colorrectales (tumores, $n = 6$) y aquellos que la suministran al colon normal (control, $n = 6$), tratados o no tratados ($n = 6-7$) con ortovanadato sódico (10^{-3} M). Los valores representan la media \pm error estándar de la media. ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$ estadísticamente significativo en comparación con los segmentos no tratados.

4.1.3. Respuesta de las arterias a la bradiquinina en presencia/ausencia de ortovanadato.

En los segmentos precontraídos con U46619, la bradiquinina produjo una relajación de manera dosis-dependiente, que era similar en arterias controles y tumorales ($PD_2 = 6,89 \pm 0,30$, $n = 7$ frente a $7,11 \pm 0,24$, $n = 7$, respectivamente) (Figura 37).

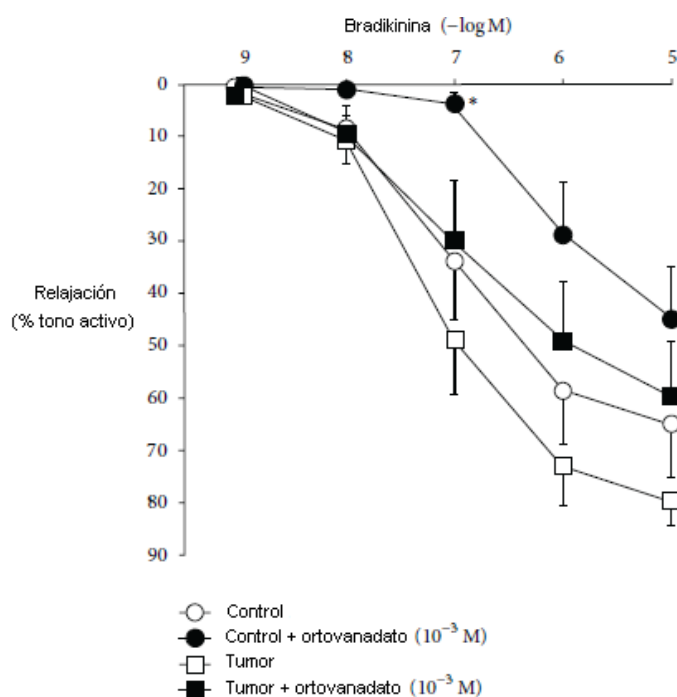


Figura 37. Relajación en respuesta a la bradiquinina (10^{-9} - 10^{-5} M) de arterias mesentéricas que suministran sangre a los tumores colorrectales (tumores, $n = 7$) y aquellas que la suministran al colon normal (control, $n = 7$), precontraídas con U46619 tratadas y no tratadas ($n = 8$) con sodio ortovanadato (10^{-3} M). Los valores se representan como la media \pm error estándar de la media. * $P < 0,05$ estadísticamente significativa en comparación con los segmentos no tratados.

El tratamiento con ortovanadato de sodio redujo esta relajación en arterias de control ($PD_2 = 6,00 \pm 0,15$, $n = 8$, $p < 0,05$); sin embargo, en las arterias tumorales, este tratamiento no modificó la relajación de la bradiquinina ($PD_2 = 6,67 \pm 0,27$, $n = 8$). El tono contráctil producido por U46619 fue similar en las arterias tumorales y controles, con y sin pretratamiento con ortovanadato de sodio.

4.1.4. Expresión génica de los receptores de VEGF en tejido arterial.

El análisis cuantitativo de PCR-RT reveló una significativa disminución de la expresión de VEGF-A en las arterias tumorales en comparación con el control ($1,18 \pm 0,20$ frente a $0,36 \pm 0,06$, $p < 0,05$). La expresión del gen de KDR y FLT1, principales receptores de VEGF-A en las arterias, fue significativamente menor en arterias tumorales que en arterias controles (60% y 64%, respectivamente, $p < 0,05$). (Figura 38).

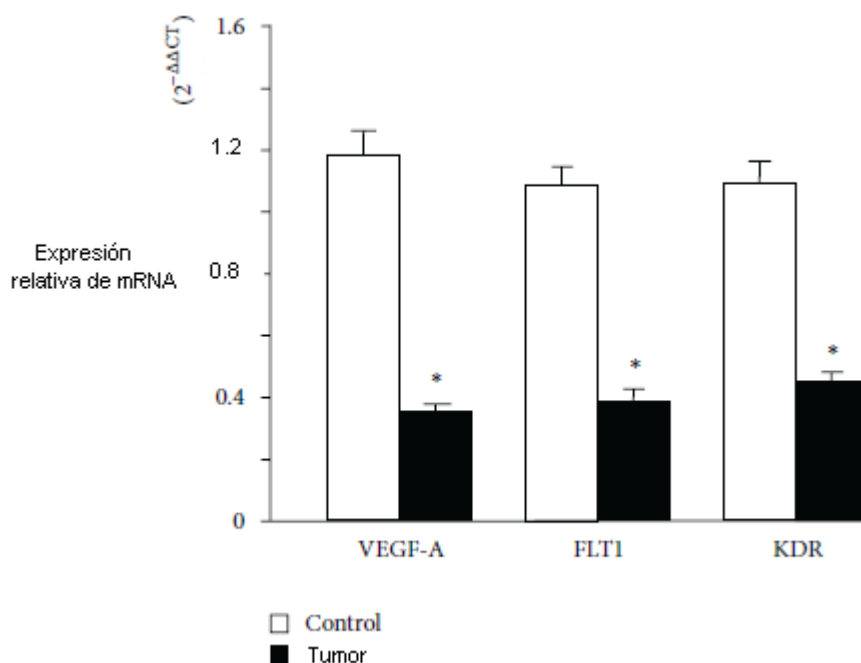


Figura 38: Análisis RT-PCR de la expresión de ARNm para VEGF-A, FLT1 y KDR en las arterias mesentéricas que suministran sangre a los tumores colorrectales (tumor, $n = 6$) y los que la suministran al colon normal (control, $n = 6$). Los valores se normalizaron a la expresión del ARNm GAPDH. Los datos son presentados como media \pm error estándar de la media. * $P < 0.05$ estadísticamente significativa frente a muestras de control.

4.1.5. Expresión proteica de los receptores de VEGF en tejido arterial.

Posteriormente, investigamos la expresión proteica del VEGF-A, FLT1, y KDR por Western blot y encontramos que la expresión proteica de VEGF-A y FLT1 fue similar en el control y en los tejidos vasculares tumorales. Sin embargo, en las muestras de arterias tumorales, hay un aumento significativo en la expresión de la proteína de KDR ($P < 0.05$ vs control). (Figura 39).

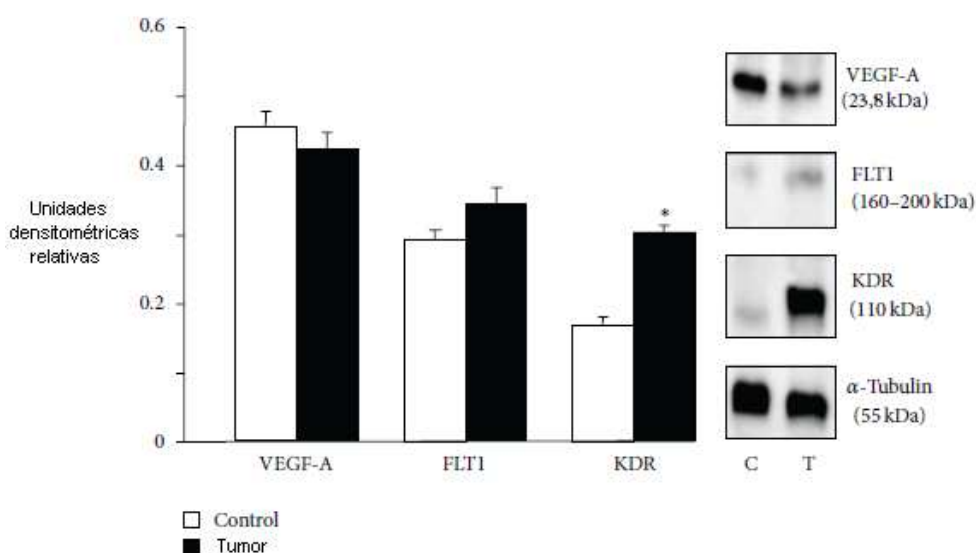


Figura 39. Expresión de proteínas en las arterias mesentéricas que suministran sangre a los tumores colorrectales (T, $n = 10$) y las que lo hacen al colon normal (C, $n = 10$). VEGF-A, FLT1, KDR y la expresión de α -tubulina se determinaron por Western Blot. Los datos se presentan como medias \pm error estándar de la media. * $P < 0,05$ estadísticamente significativo en comparación con las muestras de control.

4.2. ESTUDIO DE LOS NIVELES SÉRICOS DE FACTORES PRO-INFLAMATORIOS Y ANGIOGÉNICOS:

Los niveles séricos de IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN γ y VEGF se muestran en la Tabla 8.

	NO OBESO	OBESO	NOB-CC	OB-CC
IL-2 (pg/ml)	ND	1,48 \pm 0,74	ND	0,39 \pm 0,12
IL-4 (pg/ml)	0,38 \pm 0,09	0,14 \pm 0,07	0,24 \pm 0,08	0,87 \pm 0,18^{bc}
IL-6 (pg/ml)	2,19 \pm 0,58	5,19 \pm 1,16	4,86 \pm 1,51	13,60\pm2,93^{abc}
IL-8 (pg/ml)	5,18 \pm 0,40	4,23 \pm 0,42	9,60 \pm 1,77^b	15,64 \pm 3,50^{bc}
IL-10 (pg/ml)	0,22 \pm 0,11	2,29 \pm 1,44	2,25 \pm 1,22	3,28 \pm 1,40
GM-CSF (pg/ml)	35,6 \pm 17,8	15,29 \pm 4,47	22,33 \pm 7,08	171,7 \pm 75^{bc}
IFN-γ (pg/ml)	2,71 \pm 2,71	44,34 \pm 27,5	7,48 \pm 3,73	84,45 \pm 35,20
TNF-α (pg/ml)	1,33 \pm 1,33	2,36 \pm 1,32	0,95 \pm 0,48	3,91 \pm 1,20
VEGF (pg/ml)	16,88 \pm 11,23	38,27 \pm 13,04	40,54 \pm 14,70	184 \pm 53^{abc}

TABLA 8. Niveles plasmáticos de interleuquinas (IL) 2 , 4 , 6 , 8 , 10 , del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM -CSF), del interferón-gamma (IFN- γ) , del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en sujetos no obesos y obesos con y sin colorrectal. Los datos se representan como la media \pm desviación media estándar (n = 9). (a = estadísticamente diferentes vs no obesos; b = estadísticamente diferentes vs obesos; c = estadísticamente diferentes vs NOB-CC) (ND: no datos).

Ni el cáncer ni la obesidad inducen un efecto significativo en IL-2, IL-10, IFN- γ y los niveles séricos de TNF- α . Sin embargo, los niveles de IL-6 en suero se incrementaron en respuesta tanto al carcinoma colorrectal ($F = 8,78$; $P < 0,01$) como a la obesidad ($F = 7,82$; $P < 0,01$). Los pacientes OB-CC presentaron mayores niveles de IL-6 que los pacientes no obesos con y sin carcinoma colorrectal ($P < 0,05$ para ambos) y que los pacientes obesos sin cáncer colorrectal ($P < 0,01$). Igualmente los niveles séricos de IL-4 fueron significativamente superiores en los pacientes CC-OB en comparación con los pacientes obesos ($p < 0,001$) y los pacientes no obesos con CC ($P < 0,01$).

Los niveles séricos de IL-8 se mantuvieron sin cambios en respuesta a la obesidad, pero aumentaron en respuesta al carcinoma colorrectal ($F = 16.86$, $P < 0,001$). Los pacientes OB-CC mostraron niveles más elevados de esta citoquina en comparación con los pacientes obesos sin carcinoma colorrectal y con los pacientes NOB-CC ($P < 0,001$).

Las concentraciones séricas de GM-CSF estaban incrementadas en los pacientes OB-CC en comparación con los pacientes obesos ($P < 0,01$) y con los pacientes NOB-CC ($P < 0,05$).

Por último, los niveles séricos de VEGF se encontraban incrementados en respuesta tanto al cáncer ($F = 8.71$, $P < 0,01$) como a la obesidad ($F = 6.90$, $P < 0.05$). Además, los pacientes OB-CC tenían niveles significativamente más altos de este factor angiogénico que los pacientes NOB-CC y los no obesos sin carcinoma colorrectal ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente), y que los pacientes obesos sin cáncer colorrectal ($P < 0,01$).

4.3. ESTUDIO DEL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL:

4.3.1. Concentraciones de nitritos y nitratos en explantes de tejido adiposo visceral abdominal.

Las concentraciones basales e inducidas por LPS de nitritos y nitratos procedentes de explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes con carcinoma colorrectal se muestran en las figuras 40 y 41, respectivamente. Dentro de los pacientes con carcinoma colorrectal, la grasa visceral abdominal procedente de un lugar alejado del tumor se consideró grasa no tumoral (NTF), mientras que la grasa visceral abdominal que rodea el tumor se consideró grasa tumoral (TF). Las concentraciones de nitritos y nitratos secretadas por los explantes NTF fueron similares a las de los explantes de los pacientes sin carcinoma colorrectal. Sin embargo, las concentraciones de nitritos y nitratos secretadas por explantes TF fueron significativamente más altas que las secretadas por los explantes controles ($P < 0,01$). Del mismo modo, la administración al medio de cultivo de LPS (1-10000 ng / ml) indujo una mayor liberación de nitritos y nitratos en TF que en explantes NTF a todas las dosis estudiadas ($P < 0,05$ para todos).

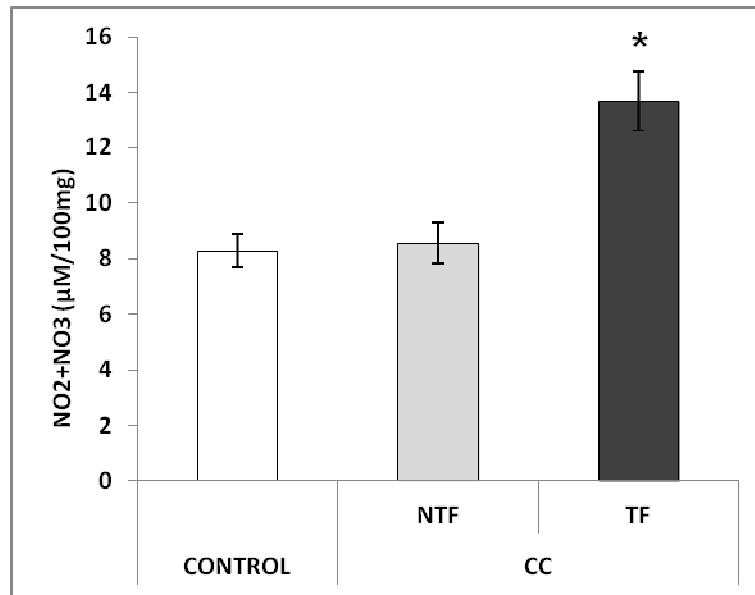


Figura 40. Concentraciones basales de nitritos y nitratos procedentes de explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes con carcinoma colorrectal. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (* P < 0,05 frente a control).

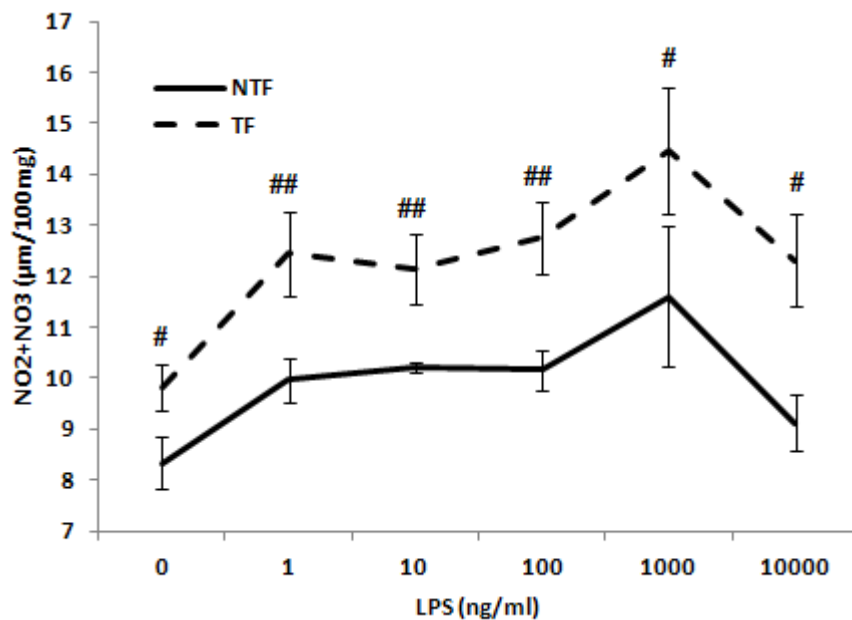


Figura 41. Concentraciones de nitritos y nitratos inducidas por LPS procedentes de explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes con carcinoma colorrectal. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (# P < 0.05 vs NTF; ## P < 0.01 vs NTF).

Dentro de los explantes TF la liberación de nitritos y nitratos fue significativamente mayor en explantes de pacientes obesos en comparación con los pacientes no obesos con cáncer colorrectal ($P < 0,001$; Figura 42).

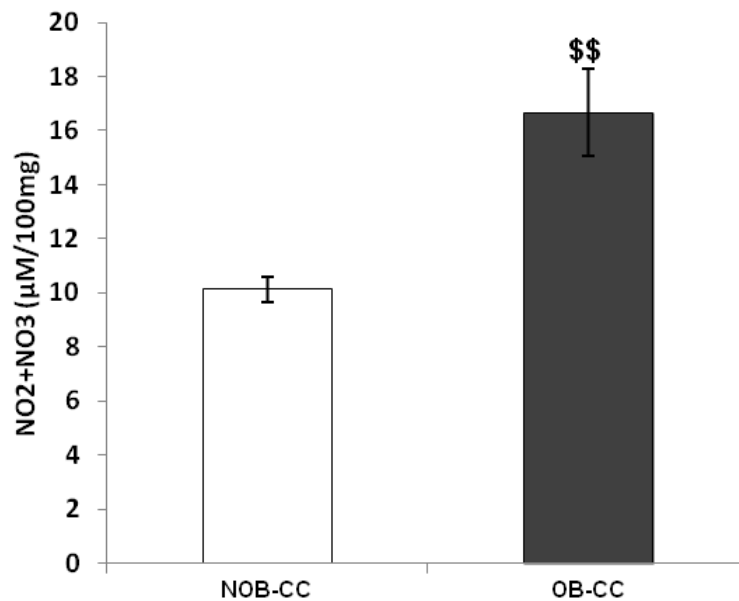


Figura 42. Gráfica de liberación de nitritos y nitratos en pacientes NOB-CC Y OB-CC. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media ($n = 6$ explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). ($$$ P < 0.01$ vs NOB-CC).

4.3.2. Concentraciones de nitritos y nitratos en los adipocitos maduros aisladas de tejido adiposo visceral abdominal.

La liberación de nitritos y nitratos se mantuvo sin cambios en los adipocitos maduros aislados de NTF comparados con los adipocitos maduros aislados de la grasa de control. Por el contrario, los adipocitos maduros aislados de TF liberaron concentraciones significativamente más altas de nitritos y nitratos que los adipocitos maduros aislados de la grasa de control. Del mismo modo, la administración de LPS (1-10000 ng / ml) al medio de cultivo indujo una mayor liberación de nitritos y nitratos en adipocitos procedentes del TF que en adipocitos procedentes de NTF a todas las dosis estudiadas ($P < 0,05$ para todos). (Figuras 43 y 44).

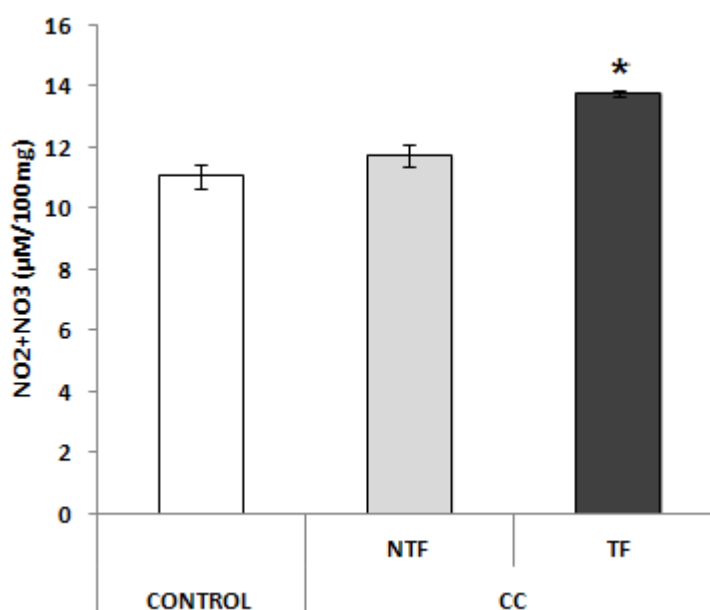


Figura 43. Concentraciones basales de nitritos y nitratos procedentes de adipocitos maduros de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes con carcinoma colorrectal. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media ($n = 6$ explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (* $P < 0,05$ frente a control).

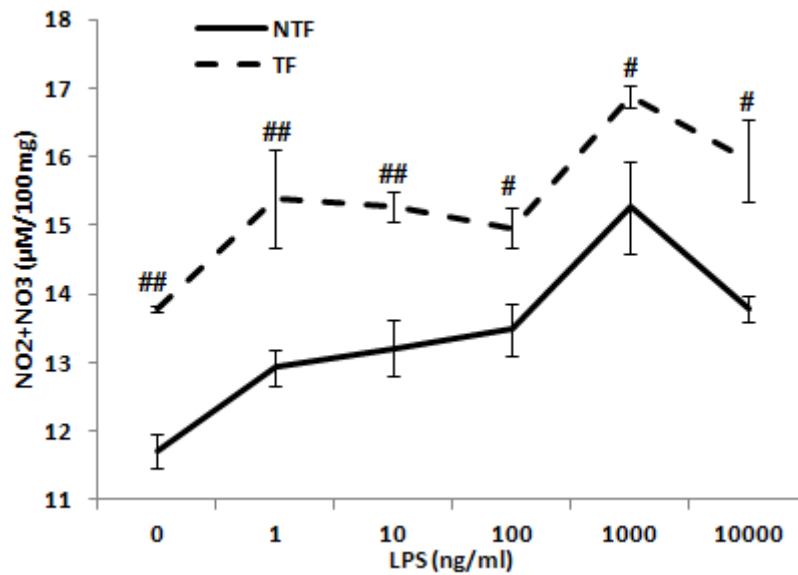


FIGURA 44. Concentraciones de nitritos y nitratos inducidas por LPS procedentes de adipocitos maduros de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes con carcinoma colorrectal. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (# P < 0.05 vs NTF; ## P < 0.01 vs NTF).

4.3.3. Expresión génica de la adiponectina, IL-6, IL-10 y TNF- α en explantes TF.

Dado que las concentraciones de nitritos y nitratos sólo se vieron modificadas en el tejido adiposo peritumoral (TF) y no en el tejido adiposo alejado del tumor (NTF), la expresión génica de diferentes citoquinas pro y anti-inflamatorias y factores angiogénicos se midió únicamente en explantes procedentes de TF.

La expresión de adiponectina fue mayor en el TF de los pacientes con carcinoma colorrectal, tanto delgados como obesos, en comparación con los controles ($P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente; Figura 45). Dentro de los pacientes carcinoma colorrectal, la expresión génica de adiponectina fue mayor en explantes TF de pacientes obesos que en los explantes TF de pacientes delgados ($P < 0.05$). La administración de LPS no modificó los niveles de expresión de adiponectina en ninguno de los grupos experimentales.

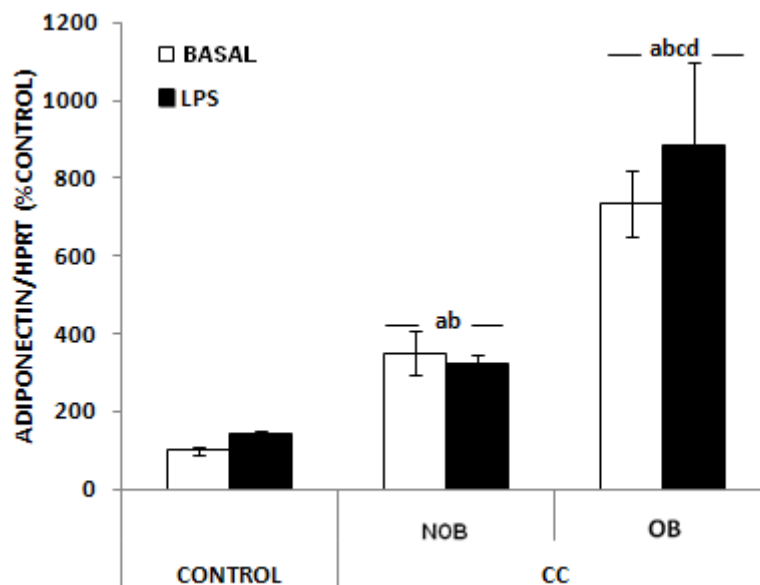


Figura 45. Expresión génica de la adiponectina en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS).

La expresión génica de IL-6 y de IL-10 se mantuvo sin cambios en explantes TF de pacientes con cáncer colorrectal, tanto obesos como no obesos, en comparación con los controles (Figura 46 y 47). El LPS aumentó tanto la expresión de IL-6 como de IL-10 en explantes TF de pacientes del grupo control ($p < 0,001$) y en explantes TF de pacientes OB-CC ($P < 0,001$), pero no en explantes TF de pacientes no obesos con cáncer colorrectal. El aumento en la expresión de IL-6 inducido por el LPS fue significativamente mayor en los explantes TF de pacientes de control que en explantes TF de pacientes OB-CC ($P < 0,001$).

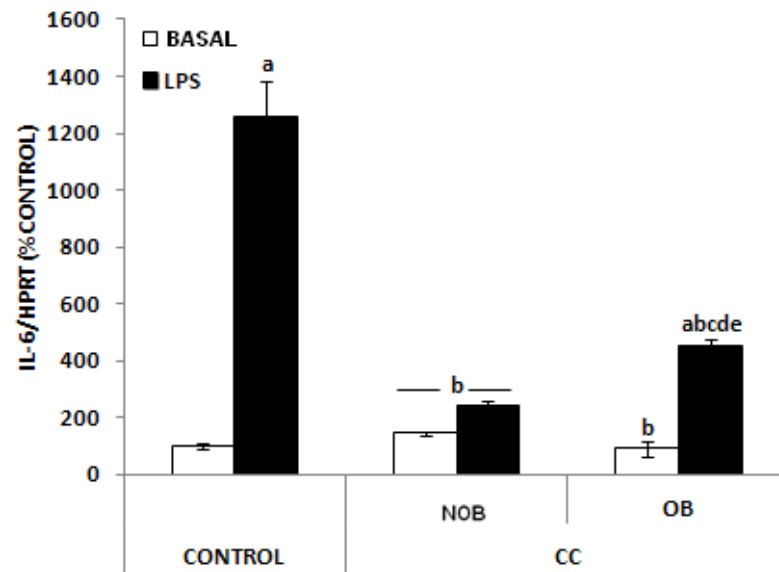


Figura 46. Expresión génica de la IL-6 en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS, e = diferencia estadísticamente significativa de OB-CC)

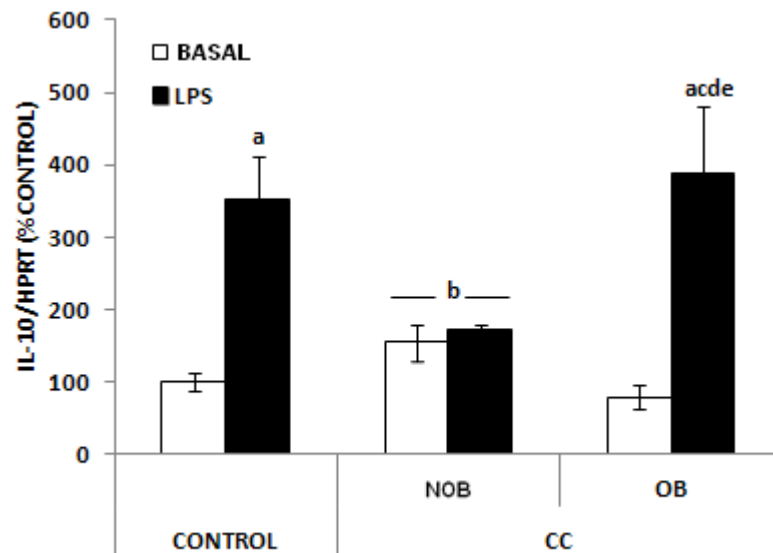


Figura 47. Expresión génica de la IL-10 en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS; e = diferencia estadísticamente significativa de OB-CC).

La expresión de TNF- α estaba aumentada en explantes TF de pacientes con cáncer colorrectal, tanto delgados como obesos, en comparación con explantes de pacientes del grupo control ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente). La administración de LPS aumentó de manera similar la expresión génica de TNF- α en explantes de pacientes del grupo control ($p < 0,001$) y en explantes TF de pacientes OB-CC ($P < 0.01$) y disminuyó la expresión de TNF- α en explantes TF de pacientes NOB-CC ($P < 0,05$). (Figura 48)

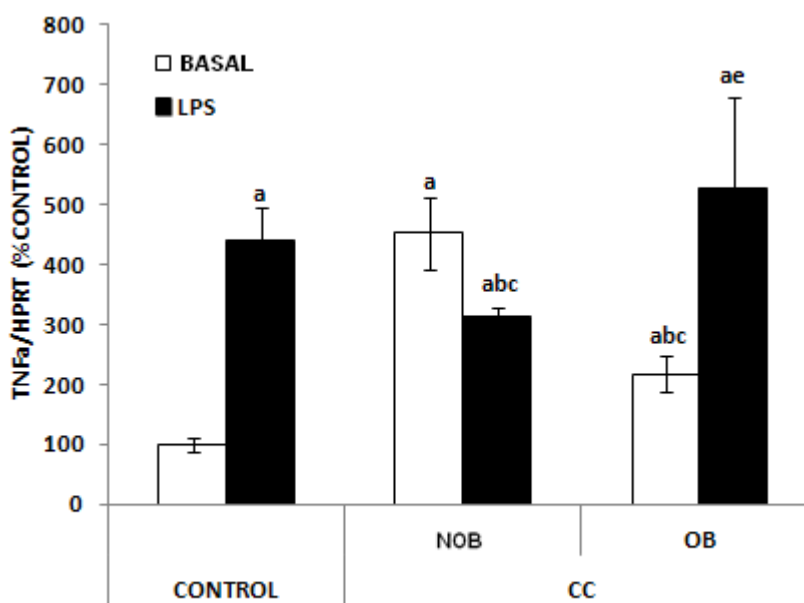


Figura 48. Expresión génica del TNF- α en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media ($n = 6$ explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; e = diferencia estadísticamente significativa de OB-CC).

4.3.4. Expresión génica del IGF-I y del VEGF en explantes TF.

La expresión del gen IGF-I se muestra en la Figura 49.

La expresión del gen del IGF-I fue significativamente mayor en los explantes TF de pacientes con carcinoma colorrectal, tanto obesos como no obesos, en comparación con los explantes controles ($P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente). La administración de LPS redujo los niveles de IGF-I mRNA en explantes de control y en explantes TF de pacientes NOB-CC ($P < 0.05$ para ambos), pero no en explantes TF de pacientes OB-CC.

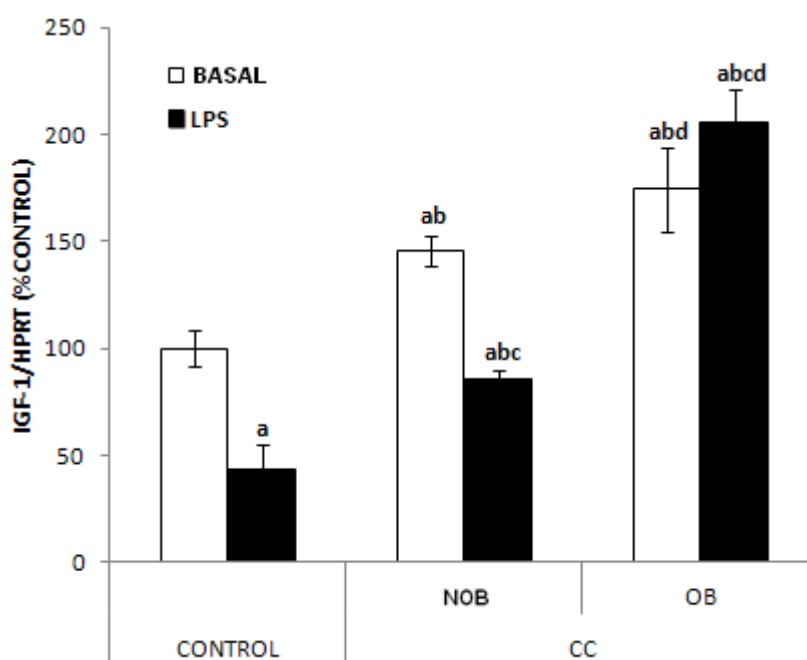


Figura 49. Expresión génica del IGF-1 en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media ($n = 6$ explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS).

La expresión del gen del VEGF no se modificó en explantes TF de pacientes NOB-CC pero se redujo significativamente en explantes de pacientes OB-CC en comparación con explantes de control ($P < 0,05$; Figura 50). El LPS aumentó significativamente la expresión del gen VEGF en explantes de control ($P < 0,05$), pero no en explantes TF de pacientes carcinoma colorrectal.

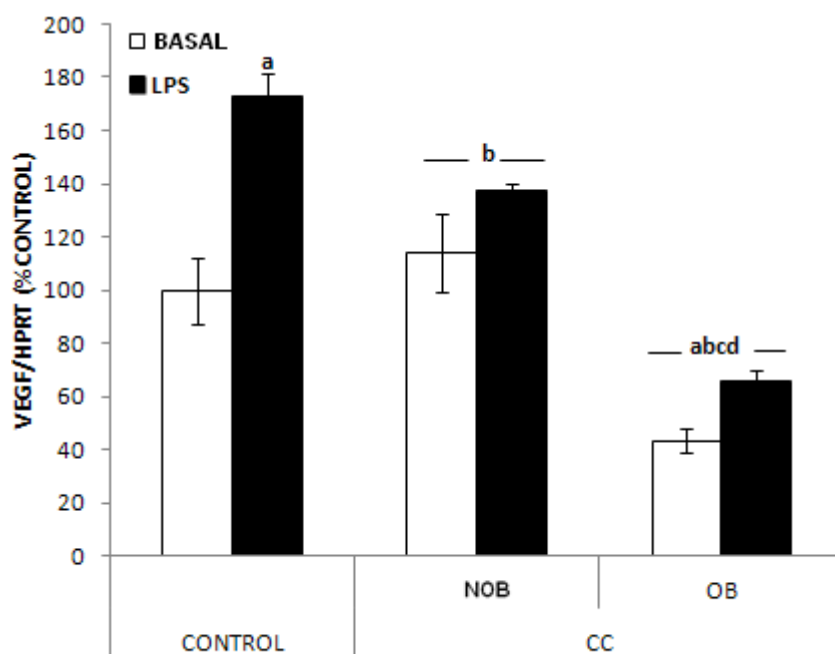


Figura 50. Expresión génica del IGF-1 en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media ($n = 6$ explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS).

4.3.5. Expresión génica de COX-2 y PPAR-gamma en explantes TF.

La expresión génica de la COX-2 estaba incrementada en explantes TF de pacientes con cáncer colorrectal, tanto no obesos como obesos, en comparación con los controles ($p < 0,05$ para ambos; Figura 51). La administración de LPS aumentó significativamente los niveles de COX-2 RNAm en explantes de control y en mayor medida en explantes TF de pacientes OB-CC ($P < 0,001$ y $P < 0,05$, respectivamente).

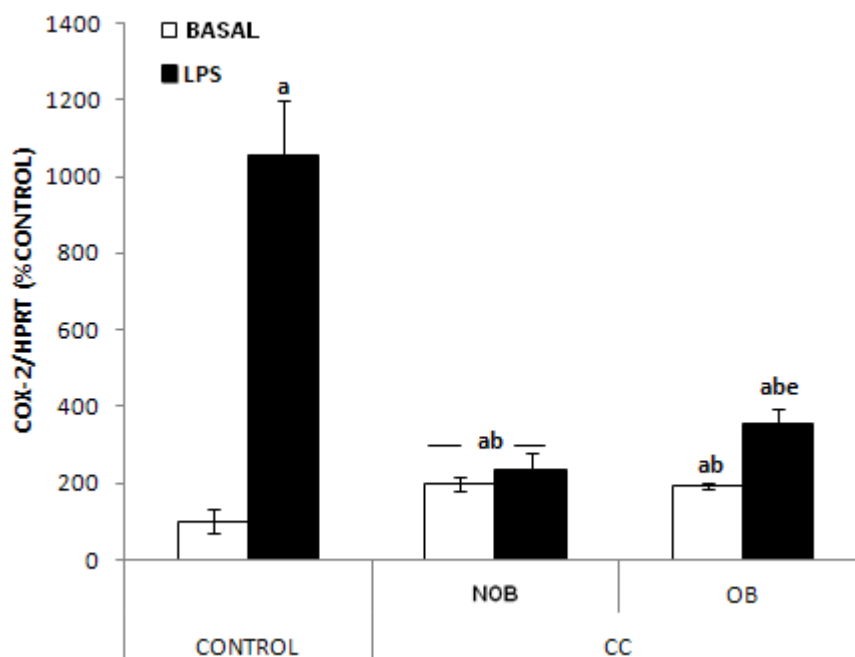


Figura 51. Expresión génica de COX-2 en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media ($n = 6$ explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; e = diferencia estadísticamente significativa de OB-CC).

Los niveles de ARNm de PPAR-gamma en explantes de pacientes de control y cáncer colorrectal se muestran en la Figura 52. El carcinoma colorrectal indujo una estimulación en los niveles de mRNA de PPAR-gamma en explantes TF tanto en pacientes delgados como en obesos. El LPS disminuyó significativamente la expresión del gen PPAR-gamma en explantes de control y en explantes TF de pacientes no obesos con CC (P <0,05 para ambos) pero no en explantes de pacientes TF OB-CC.

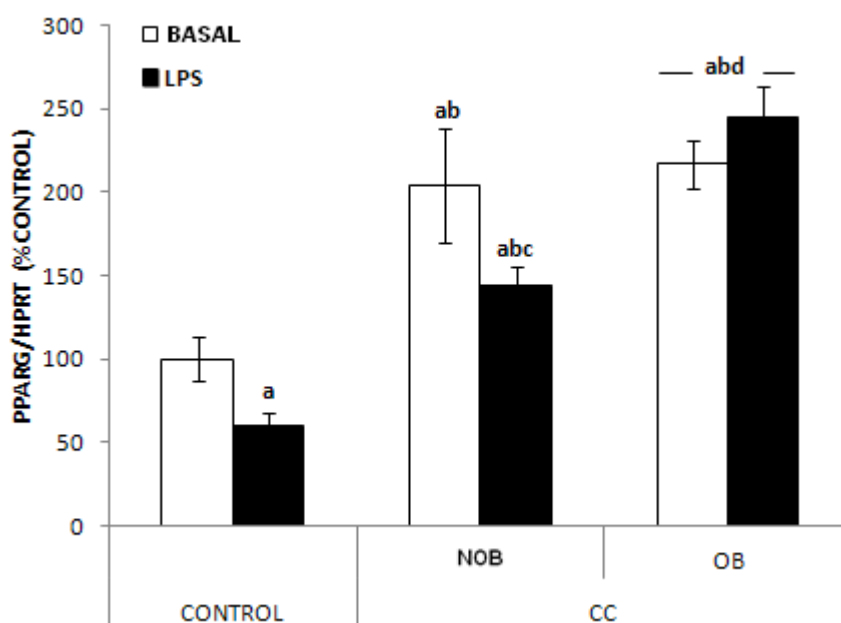


Figura 52. Expresión génica de PPARG-gamma en explantes de la grasa visceral abdominal obtenidas de pacientes sin cáncer colorrectal (controles) y pacientes NOB-CC y OB-CC basal y frente a LPS (100 ng/ml). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (n = 6 explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS).

4.3.6. Concentraciones de nitritos y nitratos de explantes y de adipocitos maduros de TF en respuesta al LPS en presencia de meloxicam y BADGE.

Para estos experimentos sólo se utilizaron explantes TF de pacientes OB-CC.

La liberación de nitritos y nitratos en explantes de TF basal y en respuesta al LPS y en presencia del inhibidor de la COX-2 meloxicam (10^{-9} M) y del antagonista de PPAR-gamma bisfenol A diglicidiléter (BADGE) (10^{-9} M) se representa en la Figura 53. El LPS aumentó la liberación de nitritos y nitratos en explantes TF ($P < 0.05$) mientras que el meloxicam y el BADGE por sí solos no modificaron la liberación de nitritos y nitratos al medio de cultivo. Por el contrario tanto el meloxicam como el BADGE aumentaron la producción de nitritos y nitratos en explantes TF al añadirse junto con LPS ($P < 0,01$ para ambos).

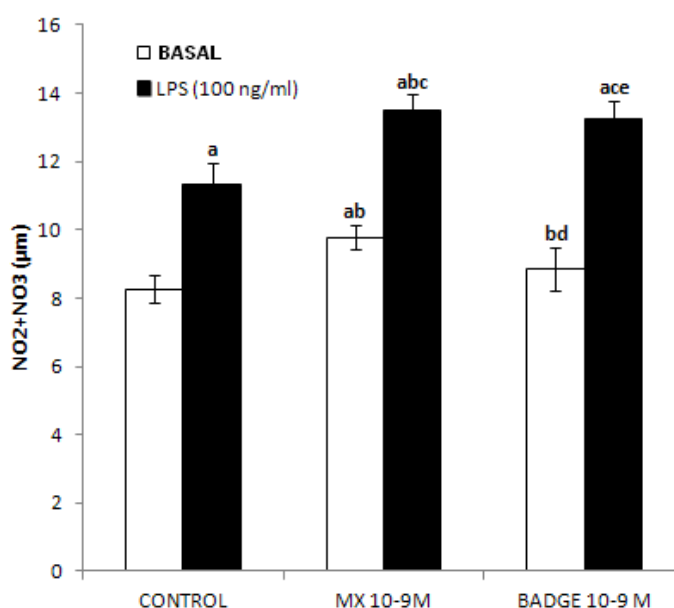


Figura 53. Liberación de nitritos y nitratos en explantes de grasa, basal y en respuesta al LPS en pacientes OB-CC en ausencia (CONTROL) y en presencia de meloxicam (10^{-9} M) y de bisfenol A diglicidiléter (BADGE) (10^{-9} M). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media ($n = 6$ explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a meloxicam 10^{-9} M; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS; e = diferencia estadísticamente significativa frente a BADGE 10^{-9} M).

La secreción de nitritos y nitratos en presencia de LPS, meloxicam y BADGE se evaluó también en adipocitos maduros aislados de TF. El LPS y el meloxicam aumentaron la liberación de nitritos y nitratos al medio de cultivo ($P < 0.01$ para ambos). La incubación de los adipocitos con meloxicam o BADGE no previnieron el aumento en la liberación de nitritos y nitratos inducido por el LPS. De hecho, la liberación de nitrato y nitrito fue mayor en los adipocitos incubados con BADGE + LPS que en los adipocitos incubados solo con LPS ($P < 0,05$). (Figura 54).

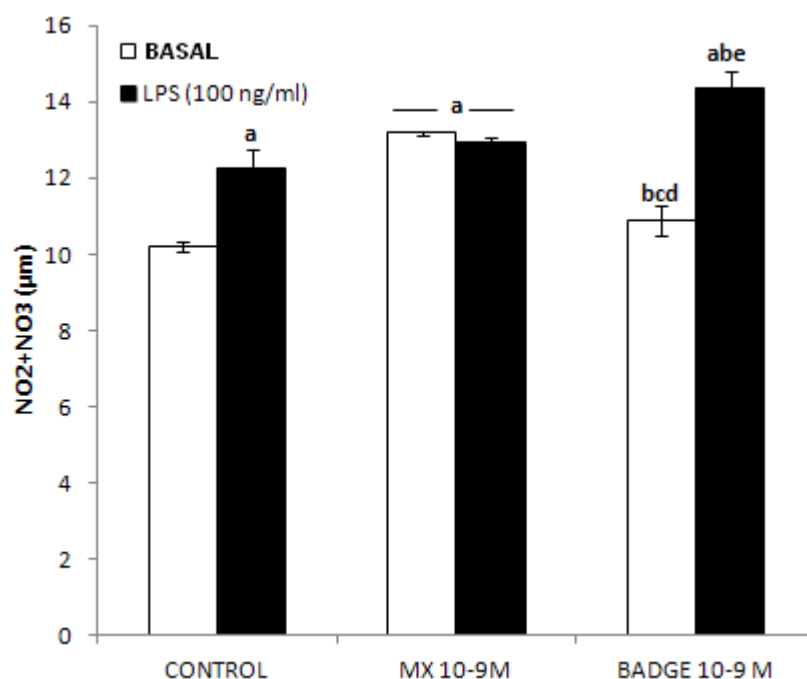


Figura 54. Liberación de nitritos y nitratos en adipocitos maduros, basal y en respuesta al LPS en pacientes OB-CC en ausencia (CONTROL) y en presencia de meloxicam (10^{-9} M) y de bisfenol A diglicidiléter (BADGE) (10^{-9} M). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media ($n = 6$ explantes de 4 pacientes diferentes en cada grupo). (a = diferencia estadísticamente significativa frente a control; b = diferencia estadísticamente significativa frente a control + LPS; c = diferencia estadísticamente significativa frente a meloxicam 10^{-9} M; d = diferencia estadísticamente significativa frente a NOB-CC + LPS; e = diferencia estadísticamente significativa frente a BADGE 10^{-9} M).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN.

Los estudios sobre los efectos del VEGF se han realizado fundamentalmente en modelos experimentales, principalmente en animales, y en arterias humanas procedentes de autopsias. Nuestro estudio se ha realizado en arterias humanas y tejido graso extraídos de pacientes intervenidos quirúrgicamente con el diagnóstico de adenocarcinoma colorrectal por lo que nos acerca, en mayor grado, a la situación más fisiológica en la que se desarrollan este tipo de tumores.

El manejo de las piezas quirúrgicas debe ser exquisito para evitar el daño y exéresis de los ganglios locorregionales y así no comprometer el estadiaje tumoral del que depende la necesidad o no de tratamiento coadyuvante postquirúrgico en ausencia de metástasis a distancia. En nuestro caso, las piezas fueron manejadas únicamente por dos cirujanos colorrectales expertos y el estadiaje no se vio afectado en ninguno de los pacientes.

El músculo liso vascular y el endotelio de dichas arterias estaban en buenas condiciones porque respondían al potasio y relajaban a la bradiquinina de manera adecuada al inicio de los estudios.

El VEGF también induce vasodilatación dosis dependiente in vitro y produce taquicardia transitoria e hipotensión cuando se administra vía sistémica. Estos efectos parecen estar mediados por el óxido nítrico derivado de las células endoteliales (Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H, 1996; Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. 1993).

Los tumores sólidos, independientemente de su tipo y origen, para su crecimiento precisan oxígeno y nutrientes que sólo pueden ser aportados por una buena irrigación sanguínea. Por ello, estimulan la formación de nuevos

vasos sanguíneos mediante la producción de factores como VEGF que son mitogénicos para células vasculares endoteliales y que juegan un papel esencial en la angiogénesis. Los VEGF son segregados por células tumorales y macrófagos y se unen a VEGFR, otra familia de RTKs. Hay tres miembros de VEGFR: VEGFR1 (conocido también como fms-like tirosina quinasa o FLT1), VEGFR2 (Kinase insert domain receptor KDR o FLK-1) y VEGFR3 (también conocido como fms-like tirosina quinasa 4 o FLT 4). La variante soluble, sVEGFR1, carece del dominio intracelular tirosina quinasa. VEGFR1 y VEGFR2 median el proceso de angiogénesis mientras que VEGFR2 y VEGFR3 están implicados en linfoangiogénesis, es decir el crecimiento de nuevos vasos linfáticos. La linfoangiogénesis, acompaña muchas veces a la angiogénesis y contribuye a la metástasis tumoral. La expresión de VEGFR es específica de célula. Todo ello, hace que la angiogénesis constituya una estrategia muy interesante, en el tratamiento anticanceroso (Ortiz Melón, JM., 2009).

La acción del VEGF se lleva a cabo a través de un sistema de fosforilación reversible que permite la activación de diferentes proteínas que median la angiogénesis.

La fosforilación de la tirosina también puede regular la contracción del músculo liso vascular. Las células del músculo liso vascular muestran niveles de actividad de la tirosina quinasa que son relativamente altos (Elberg G., J. Li, A. Leibovitch, y Y. Shechter, 1995). La inhibición de la tirosina-fosfatasa con sodio ortovanadato produce contracción de músculos lisos de aorta de rata (Yu J., Mizumoto K. y cols, 2005) o del pene de rata arteria (Villalba N., A. Kun, E. Stankevicius, y U. Simonsen, 2010) y la hipoxia estimula la contracción en venas pulmonares de ovejas (Uzun O. y A. T. Demiryürek, 2003) y la

serotonina en la arteria basilar de la rata (Kitazono T., S. Ibayashi, T. Nagao, K. Fujii, T. Kagiya, y M. Fujishima, 1998).

La fosforilación de la tirosina puede ser la base de una regulación diferencial de la función vascular en tumores colorrectales. La fosforilación de la tirosina se sabe que puede producir contracción en la musculatura lisa vascular (Yu J., K. Mizumoto, T. Kakutani, A. Hasegawa, K. Ogawa, and Y. Hatano, 2005) y no vascular (Alcón S. y cols., 2000; Grasa L. y cols., 2006; Kafi H. E. y Elkashef H. A., 2006; Zhao L. y cols., 2012).

En nuestro estudio, la inhibición de las tirosina-fosfatasa por ortovanadato ha producido efectivamente vasoconstricción de arterias mesentéricas. Esta contracción se inhibió por el inhibidor de tirosina quinasa, genisteína, lo que sugiere que es debido al aumento de la fosforilación de tirosina. La contracción producida por la fosforilación de tirosina ha sido relacionada con un aumento en el flujo de calcio (Villalba N., Kun A., Stankevicius E., Simonsen Y. U., 2010; Wijetunge S. y cols., 1996) o aumento de la sensibilidad al calcio de los mecanismos contráctiles intracelulares (Masui H. y Wakabayashi I., 2000; Di Salvo J., Pfitzer G. y Semenchuk L. A., 1994).

Aunque el ortovanadato contrajo tanto las arterias control como las tumorales, la contracción fue menor en arterias tumorales, lo que sugiere una reducción de la fosforilación de la tirosina en el efecto contráctil en estas arterias. También, hemos encontrado que el ortovanadato reduce la contracción a la noradrenalina en arterias tumorales, pero no en las arterias de control. Esto contrasta con las observaciones en aorta y las arterias mesentéricas de conejo, en las que la fosforilación de la tirosina aumenta la vasoconstricción adrenérgica (Adegunloye B. J. y cols., 2003). Por lo tanto, el

efecto inhibidor observado en el presente estudio puede ser específico para las arterias tumorales. Si la fosforilación de la tirosina tiene un efecto inhibidor en las arterias tumorales pero no en las arterias normales, también se podría explicar la menor contracción producida por el ortovanadato en las arterias tumorales en base al efecto inhibidor de la fosforilación que podría contrarrestar la vasoconstricción, que sí es observada en las arterias de control.

El ortovanadato también redujo la vasodilatación dependiente del endotelio en las arterias mesentéricas de arterias controles. Algunos estudios han encontrado que las tirosina quinasas pueden aumentar la liberación de óxido nítrico endotelial (Kitazono T., Ibayashi S., Nagao T., Fujii K., Kagiya T., y Fujishima M., 1998; Hisayama T. y cols., 1995; Mulle J. M. y cols., 1996; Nakaike R. y cols., 1996; Sharma S. y cols., 2011; Yousif M. H. M. y cols., 2005). Sin embargo, la fosforilación de la tirosina ha sido también relacionada con la disfunción endotelial en la diabetes (Yousif M. H. M. y cols., 2005), la hiperhomocisteinemia (Shah D. I. y Singh M., 2006), y con el fenómeno de Raynaud (Furspan P. B. y cols., 2005).

En arterias mesentéricas de control, el ortovanadato reduce la vasodilatación dependiente del endotelio inducida por la bradicinina. Sin embargo, en las arterias tumorales el ortovanadato no redujo significativamente esta relajación. Esto apuntaría a un posible efecto constrictor de la fosforilación de tirosina en estas arterias, como hemos planteado en la hipótesis anterior, lo que podría compensar la relajación observada en las arterias controles.

Este posible efecto inhibidor de la fosforilación de la tirosina en las arterias no era el esperado, ya que la activación de la fosforilación de tirosina produce vasoconstricción en arterias normales (Kitazono T., Ibayashi S., Nagao

T., Fujii K., Kagiya T., y Fujishima M., 1998; Fetscher C. y cols., 2001; Liu C. y cols., 2007; Tasaki K. y cols. 2003; Watanabe M. y cols., 1998). Sin embargo, algunos receptores con actividad tirosina quinasa pueden producir vasodilatación. En este sentido se ha descrito que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) produce vasodilatación en arterias de humanos (Metais C. y cols., 1998), cerdos (Sellke F.W. y cols., 1996), y ratas (LeBlanc A. J. y cols., 2008) tanto en la circulación coronaria, como en la circulación placentaria humana (Brownbill P. y cols., 2007), las arterias pulmonares bovinas (Jacobs E. R. y cols., 2006) y mamarias y radiales arterias humanas (Liu M.H. y cols., 2002; Wei W. y cols., 2007).

Asimismo resultados de nuestro grupo demuestran que la administración de VEGF induce relajación en segmentos vasculares mesentéricos humanos precontraídos, según presentamos en la comunicación oral del XXVIII Congreso Nacional de Cirugía (García Villar O., Ferrero E. y cols., 2010). El VEGF origina vasodilatación en los segmentos vasculares estudiados con un efecto mayor al aumentar la concentración del mismo. No se han demostrado diferencias significativas entre el efecto en arterias tumorales y no tumorales.

Se ha demostrado que compuestos como el vanadato aumentan la fosforilación de los receptores VEGFR2 / KDR aumentando así sus efectos (Carr A. N. y cols., 2004; Oshikawa J. y cols., 2010; Sugano M. y cols., 2004). Por lo tanto, receptores VEGFR2 / ELIM pueden producir vasodilatación (Wei W. y cols., 2004; Li B. y cols., 2002; He H. y cols., 1999) y pueden ser activados por vanadato, lo que explicaría efecto inhibitor del ortovanadato en las arterias tumorales.

En los tejidos tumorales, la fosforilación de la tirosina está a menudo relacionada con la activación de los receptores del factor de crecimiento que tienen actividad de tirosina-quinasa, incluyendo los receptores de VEGF que pueden tener un papel central en el desarrollo del cáncer (Carmeliet, P., 2005). VEGF actúa sobre vasos sanguíneos principalmente a través de dos receptores: VEGF -R1 / FLT1 y VEGF- R2 / KDR, los cuales tienen actividad tirosina-quinasa (Olsson A.-K., A. Dimberg, J. Kreuger, y L. Claesson-Welsh, 2006; Stuttfeld E. y K. Ballmer-Hofer, 2009). La expresión de VEGF se incrementa en los tumores (Ferrara N., 2004) y en el plasma de pacientes con cáncer (Dymicka-Piekarska, V. K. Guzinska-Ustymowicz, A. Kuklinski, y H.Kemona, 2012; Peterson J. E., D. Zurakowski, J. E. Italiano Jr. y cols., 2012). Los receptores del VEGF también pueden incrementarse en los tumores, ya sea en las células tumorales o en los vasos sanguíneos que irrigan el tumor. Smith y cols. (Smith N. R., D. Baker, N. H. James y cols., 2010) encontraron que VEGFR-2 se sobreexpresa en vasos sanguíneos del cáncer colorrectal, del pulmón y en tumores de mama, pero no en las células tumorales. Sin embargo, Amaya y cols. (Amaya H., N. Tanigawa, C. Lu y cols., 1997) han informado un aumento de los receptores KDR en los vasos sanguíneos en el tumor y también en las células del cáncer colorrectal. Estos estudios han localizado receptores del VEGF en la microvascularización del tumor y no observan diferencia en la expresión en relación con el tipo de vaso sanguíneo, es decir, la arteria, capilar, o vena. La mayoría de los vasos sanguíneos en la microcirculación son capilares y vénulas, que tienen un pequeño papel en la regulación del flujo de sangre y no hay, en nuestro conocimiento, estudios

sobre la expresión de VEGF o receptores del VEGF específicamente en las arterias que irrigan el flujo sanguíneo al tumor.

Además, hemos encontrado en este estudio que la expresión proteica de receptores de KDR está incrementada en las arterias tumorales y esto podría explicar por qué este efecto inhibitor es evidente en arterias tumorales pero no en las de control. Se ha descrito que la expresión de VEGFR-1 / Flt1 (Sartelet H. y cols., 2004; Schmidt M. y cols., 2008), VEGFR2 / KDR (Reubi J. C. y cols., 2011; Takahashi H. y Shibuya M., 2005) o de ambos subtipos de receptores (Huang H. y cols., 2005; Ljungberg B. J. y cols., 2006; Mehnert J. M. y cols., 2010; Pallares J. y cols., 2006) está aumentada en varios tipos de tumores incluyendo el colorrectal (Harada Y., Ogata Y. y Shirouzu K., 2001; Okita N.T. y cols., 2009; Yin Y. y cols., 2010). Sin embargo, el presente estudio es el primero, en nuestro conocimiento, que muestra un aumento en la expresión de receptores de VEGF en las arterias que suministran el flujo sanguíneo al tumor. Estas arterias no han mutado, mientras que las células tumorales sí, pero pueden estar alteradas por factores liberados en el microambiente del tumor (Wang D., Donner D. B. y Warren R. S., 2000). En este sentido se ha descrito que las arterias que rodean el tumor muestran diferencias en la expresión del receptor en comparación con arterias normales del mismo paciente (Ferrero E. y cols., 2008, 2013). Como se sabe que los receptores de VEGF se expresan principalmente en el endotelio (Neufeld G. y cols., 1999), este aumento de la expresión en arterias tumorales podría explicar porqué la fosforilación de tirosina tiene un efecto inhibitorio en parte en estas arterias pero no en arterias normales. En arterias normales, la fosforilación de la tirosina produce contracción del músculo liso, como hemos observado, pero en las arterias

tumorales, debido a la expresión aumentada de receptores de VEGF, se activaría también mecanismos de relajación en las células endoteliales. En contraste con el hecho de que en arterias tumoral la el contenido proteico de FLT1 y KDR se mantuvo sin cambios o aumentado, la expresión génica de estos receptores estaba significativamente disminuida en las arterias tumorales. Se ha demostrado que el VEGF puede tener efectos opuestos sobre la expresión de proteína y ARNm de los receptores FLT1 y ELIM en células endoteliales humanas cultivadas de vena umbilical, que pueden ser un mecanismo adaptativo para compensar la desensibilización del receptor y permitir la recuperación de la capacidad de respuesta a VEGF (Wang D., Donner D. B. y Warren R. S., 2000).

Los resultados del estudio vascular ponen de manifiesto el mayor efecto vasodilatador del VEGF sobre las arterias que irrigan los tumores colorrectales en comparación con las arterias controles. Por tanto en presencia de VEGF las arterias que irrigan el tumor aumentarían el flujo de sangre hacia el mismo mediante un mecanismo dependiente de la fosforilación del receptor. Se ha descrito que los niveles de VEGF están aumentados en tumores colorrectales pero además otros tejidos circundantes al tumor, como es el caso del tejido adiposo peritumoral, podrían contribuir en la producción de éste y otros factores que podrían afectar al crecimiento del mismo.

Por este motivo, y dada la estrecha relación entre obesidad y cáncer colorrectal, la segunda parte de este trabajo ha consistido en analizar el tejido adiposo peritumoral como fuente de factores angiogénicos y antiinflamatorios así como la diferencias entre la secreción de dichos factores por parte del tejido adiposo peritumoral procedente de pacientes delgados y obesos.

La asociación entre la obesidad y los diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal, ha sido ampliamente reportado (Frezza, E.E., Wachtel M.S., y Chiriva-internati M., 2006; Calle, E.E. y Kaaks R., 2004). Sin embargo, a pesar de que las evidencias epidemiológicas que conectan obesidad con la incidencia de cáncer son fuertes, los mecanismos subyacentes que vinculan la obesidad con la iniciación y progresión tumoral siguen siendo poco conocidos. En el presente estudio se analizaron las concentraciones plasmáticas de diferentes citoquinas inflamatorias y factores angiogénicos en pacientes obesos y no obesos con y sin cáncer colorrectal, así como el papel del tejido adiposo peri-tumoral como posible fuente de estos factores en el cáncer colorrectal. Nuestro principal hallazgo es que los pacientes obesos con cáncer colorrectal (OB-CC) muestran un aumento los niveles plasmáticos de los factores pro-inflamatorios y angiogénicos producidos en parte por la grasa peritumoral. A nuestro entender, este es el primer estudio que informa del aumento de la producción de factores proinflamatorios y angiogénicos en explantes de grasa peritumoral de pacientes obesos con cáncer colorrectal.

Los niveles plasmáticos de IL-6, IL-4 y GM-CSF estaban significativamente incrementados en pacientes OB-CC en comparación con pacientes no obesos con cáncer colorrectal (NOB-CC) y con los sujetos control, mientras que las concentraciones plasmáticas de otros marcadores proinflamatorios sólo son estimulados en respuesta frente al cáncer (IL-8) o frente a la obesidad (IFN γ y TNF α).

El aumento en los niveles plasmáticos de diferentes citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 α , IL-6, TNF- α , la MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos) o el PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno activo) es un factor común tanto en pacientes obesos (Fontana, L. Y cols., 2007) como en pacientes con cáncer colorrectal (Catalán, V. Y cols., 2011; Hillenbrand, A. Y cols., 2012). Sin embargo hasta ahora ningún estudio había analizado las concentraciones de dichas sustancias en pacientes con cáncer colorrectal obesos y no obesos. Además en nuestro estudio los niveles plasmáticos de VEGF también se incrementaron en respuesta a tanto el cáncer como a la obesidad tal y como se había descrito previamente tanto en pacientes obesos (Silha, J.V. y cols., 2005) como en pacientes con cáncer colorrectal (Peterson, J.E. y cols., 2012).

Como los niveles plasmáticos de la mayor parte de estas citoquinas pro-inflamatorias y factores angiogénicos fueron mayores en pacientes OB-CC, y teniendo en cuenta que el tejido adiposo visceral se expande considerablemente en la obesidad, se estudió el tejido adiposo visceral abdominal como una fuente de factores inflamatorios. Para ello, examinamos el perfil inflamatorio de explantes y adipocitos maduros procedentes de tejido adiposo adyacente a la neoplasia (grasa peritumoral; TF) y tejido adiposo distante de neoplasia (grasa no peritumoral; NTF) en pacientes no obesos y obesos con CC. Como un marcador inflamatorio, hemos evaluado las concentraciones de nitritos y nitratos en el medio de cultivo. En esta condición, el óxido nítrico se produce en parte por el tejido adiposo a través de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), una enzima que se expresa principalmente por los macrófagos y, en menor medida, por los adipocitos (Andersson, K. Y cols.,

1999). Se ha demostrado que la expresión de iNOS está aumentada en el tejido adiposo en condiciones inflamatorias tales como la pancreatitis (Franco-Pons, N., Gea-Sorlí S. y Closa D., 2010) o la obesidad (Lumeng, C.N. y cols., 2007; Xu, H. Y cols., 2003). En los pacientes con cáncer colorrectal, la liberación de nitritos y nitratos estaba incrementada tanto en los explantes como en los adipocitos procedentes de TF en comparación con el tejido adiposo diseccionado de los sujetos control. Sin embargo, los explantes y los adipocitos procedentes de NTF no mostraron aumento de la secreción de nitritos y nitratos. Estos resultados muestran que el TF tiene una secreción incrementada de marcadores inflamatorios que podría contribuir a la iniciación y/o progresión del tumor. La secreción alterada de factores inflamatorios por parte del TF podría ser el resultado de un aumento de la infiltración de macrófagos (Wagner, M. Y cols., 2012), aunque nuestros resultados indican que los adipocitos procedentes del TF también liberan mayores cantidades de nitritos y nitratos que los adipocitos procedentes del NTF. Nuestros resultados concuerdan con los de otros autores que han reportado que el TF no sólo es diferente de la NTF en términos de secreción, sino también en términos de metabolismo, ya presenta una formación de lípidos y una capacidad de almacenamiento disminuida en comparación con NTF (Notarnicola, M. Y cols., 2012).

Otro resultado interesante es que, dentro del TF, los pacientes OB-CC mostraran mayores niveles de nitritos y nitratos que los pacientes NOB- CC. En la obesidad la secreción de marcadores inflamatorios por parte del tejido adiposo visceral resulta en un estado de inflamación sistémica crónica de bajo grado, el cual se atribuye a la producción de citocinas inflamatorias tanto por

los adipocitos como por la infiltración de células inmunes en el tejido (Fontana, L. Y cols., 2007). Nuestros datos coinciden con estudios previos ex vivo en explantes de tejido adiposo visceral de pacientes obesos el que se encontró incrementada la secreción de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-6 (Fried, S.K., Bunkin D.A. y Greenberg A.S. , 1998), IL-8, IL-10 y TNF- α (Fain, J.N., y cols., 2004) .

Una vez demostrado que el TF presentaba una secreción incrementada de nitritos y nitratos en comparación con el NTF y con el tejido adiposo visceral de individuos controles analizamos también la expresión génica de diferentes adipoquinas y factores angiogénicos en este tejido tanto en los pacientes NOB-CC y OB-CC como en los individuos controles. Además, para evaluar el perfil de secreción de este tejido en respuesta a un estímulo inflamatorio, se añadió LPS al medio de cultivo. La expresión del gen de la adiponectina, del TNF- α , y del IGF-I aumentó en los pacientes con cáncer colorrectal en comparación con los controles mientras que los niveles de IL-6 e IL-10 mRNA se mantuvieron sin cambios. Nuestros datos están de acuerdo con los resultados anteriores en los que la expresión del gen de IGF-I y del TNF- α mRNA estaban incrementados en el tejido adiposo visceral de pacientes con cáncer colorrectal (Catalán, V. y cols. 2011). La producción incrementada de estos factores por el tejido adiposo visceral podría contribuir, especialmente en pacientes OB-CC, a la creación de un ambiente que promueva el crecimiento y la progresión del tumor (Harvey, A.E., Lashinger L.M., Y Hursting S.D., 2011). Sin embargo, el aumento en la síntesis de la adiponectina, adipokina anti-inflamatoria y anti-proliferativa (Sugiyama, M. Y cols., 2009), en explantes TF en pacientes con cáncer colorrectal muestra que en esta condición también se

activan mecanismos anti-inflamatorios y anti-proliferativos. El LPS no modificó los niveles de ARNm de adiponectina, pero aumentó aún más la expresión génica TNF- α , IL-6 e IL-10 en explantes de control y en explantes de TF de pacientes OB-CC. Como los pacientes control y OB-CC son obesos, este efecto es posiblemente debido a una mayor infiltración de macrófagos en el tejido adiposo visceral en respuesta a la obesidad, como se ha descrito anteriormente (Fontana, L. y cols. 2007). La expresión génica de VEGF se mantuvo sin cambios en explantes TF de pacientes NOB-CC en comparación con explantes de control pero disminuyó significativamente en explantes TF de pacientes OB-CC. Dado que los niveles plasmáticos de VEGF estaban incrementados en estos pacientes, el descenso de la expresión del gen VEGF en explantes TF podría ser el resultado de un mecanismo de feed-back. El LPS indujo un aumento significativo en expresión génica de VEGF en explantes de control y OB-CC. Del mismo modo se ha descrito que la producción de VEGF aumenta en explantes de tejido adiposo mesentéricos en respuesta a una condición inflamatoria como la enfermedad de Crohn (Schaffler, A. y cols., 2006). Además, el tratamiento anti-inflamatorio con corticosteroides reduce la expresión del VEGF en los adipocitos (Li, X. Y cols., 2005). Por el contrario, el LPS disminuyó la expresión génica del IGF-I en explantes de control y de pacientes NOB-CC, tal y como se ha descrito previamente que se produce en el tejido adiposo visceral en otras condiciones inflamatorias (Granado, M. Y cols., 2009; Gude, M.F. y cols., 2012). La disminución en la expresión de IGF-I en respuesta a la inflamación está de acuerdo con estudios anteriores (Gude, M.F. y cols., 2012), y parece ser el resultado de un aumento en los niveles de diferentes citoquinas como la IL-1 β y TNF- α que inducen un estado de

catabolismo y de resistencia al IGF-I (O'Connor, J.C. y cols. 2008). Sin embargo el LPS no disminuyó la expresión génica del IGF-I en explantes TF de pacientes OB-CC, lo que significa que este tejido se mantiene metabólicamente activo incluso bajo condiciones inflamatorias.

La expresión génica de COX-2 y PPAR-gamma también estaba incrementada en explantes TF de pacientes con cáncer colorrectal en comparación con el control, pero no se observaron diferencias entre los pacientes no obesos y obesos con cáncer colorrectal. Aunque diferentes estudios han encontrado previamente un aumento tanto de PPAR-gamma como de la COX-2 en los tumores de colon (Delage, B. Y cols., 2007; DuBois, R.N. y cols., 1998), este es el primer estudio en el que se encuentra un aumento en la expresión génica de estos dos factores en el tejido adiposo peritumoral. El papel del PPAR-gamma en la carcinogénesis colorrectal no se conoce completamente, ya que algunos autores han señalado un efecto pro-tumorigénico de este receptor (Lefebvre, A.M. y cols; 1998) y otros a un efecto anti-tumorigénicos debido a su acción inhibidora sobre la proliferación y la supervivencia celular (Papi, A. y cols., 2010). De hecho los agonistas de PPAR-gamma se han utilizado para inhibir la producción de sustancias proinflamatorias y de citoquinas (Dworzanski, T. Y cols., 2010; Sharma, A.M. y Staels B., 2007) y para inhibir la angiogénesis mediante una disminución en la síntesis de VEGF (Panigrahy, D. y cols, 2002). Dentro del tejido adiposo PPAR-gamma se expresa principalmente en las células del estroma, entre las que se encuentran los pre-adipocitos, y su función principal es la de inducir la proliferación y la diferenciación de éstos en adipocitos maduros (Gimble, J.M. y cols., 1996). Las células del estroma del tejido adiposo se expanden en la

obesidad (Zhang, Y. y cols., 2012) se ha descrito que pueden infiltrarse en los tumores en varios modelos de cáncer en el ratón (Zhang, Y. y cols., 2009). Estas células tienen propiedades y promueven la vascularización y el crecimiento de los tumores (Klopp, A.H. y cols., 2012) contribuyendo a la formación de pericitos y adipocitos que pueblan el microambiente tumoral (Zhang, Y. y cols., 2012). Por lo tanto, como PPAR-gamma se expresa principalmente en las células del estroma de tejido adiposo, el aumento en la expresión de PPAR-gamma en pacientes con cáncer colorrectal podría indicar un aumento en el número de células del estroma en TF las cuales podrían afectar al crecimiento del tumor y a sus propiedades metastásicas. Por otro lado, el LPS disminuyó la expresión del gen de PPAR-gamma en explantes de pacientes de control y NOB-CC, pero no en explantes TF de pacientes OB-CC. Nuestros resultados coinciden con estudios previos en los que las condiciones inflamatorias disminuyen tanto la expresión de PPAR-gamma como la adipogénesis (Ye, J., 2008). Se ha descrito que la inflamación, además de inhibir la diferenciación de células del estroma en adipocitos, puede favorecer que las células del estroma adiposo se diferencien en células endoteliales a través de la inducción de factores angiogénicos (Ye, J. y Gimble J.M., 2011). Por lo tanto, el hecho de que la expresión del gen PPAR-gamma disminuya en el tejido adiposo de los pacientes control y NOB-CC pero no en pacientes OB-CC en respuesta a LPS significa posiblemente que en condiciones inflamatorias las células estromales del tejido adiposo se diferencian preferencialmente en células endoteliales en muestras de control y de pacientes NOB-CC, pero en pacientes CC-OB estas células podrían

diferenciarse tanto en células endoteliales como en adipocitos que podrían más tarde infiltrarse en el tumor.

Finalmente, para analizar el posible papel de PPAR-gamma en la secreción de nitritos y nitratos por los explantes de TF y los adipocitos maduros de TF se añadió bisfenol A diglicidiléter (BADGE), agonista de la PPAR-gamma, al medio de cultivo en presencia o ausencia de LPS. Nuestros resultados muestran que BADGE no modificó la secreción de nitrito y nitrato por sí solo aunque aumentó esta secreción en presencia de LPS, tanto en explantes TF como en adipocitos maduros, lo que sugiere un posible papel inhibitorio del PPAR-gamma en la secreción de marcadores inflamatorios inducida por el LPS. Igualmente, el tratamiento con BADGE aumentó aún más la secreción de marcadores inflamatorios en un modelo experimental de colitis en ratas, lo que apunta a un papel inhibitorio de los receptores PPAR-gamma en la respuesta inmune (Dworzanski, T. y cols., 2010). Del mismo modo la inhibición de la COX-2 inducida por meloxicam aumenta aún más la liberación de nitritos y el nitratos en explantes TF tanto solo como en respuesta a LPS, sugiriendo también que la COX-2 no sólo no está involucrada en la secreción de nitritos y nitratos en el TF sino que podría tener un papel protector en lo que respecta a la liberación de marcadores inflamatorios en esta condición.

En resumen, el tejido adiposo peritumoral secreta factores inflamatorios que podrían influir en la creación de un microambiente que favorezca la iniciación y/o la progresión de los procesos tumorigénicos. La mayor cantidad de tejido adiposo visceral en los pacientes obesos y la mayor secreción de factores inflamatorios por este tejido suponen por tanto un factor de riesgo para la formación y el desarrollo de los tumores colorrectales.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

1. Los niveles plasmáticos de VEGF están elevados en los pacientes con cáncer colorrectal.
2. En las arterias de los tumores colorrectales la expresión génica de los receptores Flt1/VEGF1 y KDR/VEGF2 está disminuida, posiblemente por un mecanismo compensador y la expresión proteica de los receptores para VEGF de tipo 2 (KDR/VEGF2) se encuentra aumentada.
3. Las arterias que irrigan los tumores colorrectales presentan una respuesta diferente en términos de contracción y relajación frente a diferentes estímulos vasoactivos.
4. La fosforilación de residuos de tirosina en los receptores de VEGF produce vasoconstricción en arterias mesentéricas controles, pero ese efecto es menor en las arterias de los tumores colorrectales. Esto puede redistribuir el flujo sanguíneo hacia el tumor, facilitando así su crecimiento.
5. Los niveles plasmáticos de diferentes factores inflamatorios y angiogénicos, entre ellos el VEGF, están incrementados en los pacientes con cáncer colorrectal y, en mayor medida, en aquellos pacientes con un índice de masa corporal superior a 30 kg/m².
6. La producción de nitritos y nitratos aumenta en el tejido adiposo peritumoral de pacientes con cáncer colorrectal, en comparación con tejido adiposo no tumoral de los mismos pacientes, y este efecto es mayor en el tejido adiposo peritumoral de pacientes obesos que en el de delgados.

7. La expresión de VEGF está reducida en el tejido adiposo de los pacientes obesos con cáncer colorrectal, posiblemente por un mecanismo de retroalimentación por los niveles plasmáticos elevados de este factor en estos pacientes.
8. El aumento en la liberación de marcadores inflamatorios no parece estar mediado ni por la COX-2 ni por la activación de PPAR-gamma.
9. El tejido adiposo y el tejido arterial en la región peritumoral presentan características diferentes a los tejidos alejados del tumor. Esto puede producir un microambiente proinflamatorio en la región peritumoral, con alteraciones en la regulación del flujo sanguíneo al tumor que pueden contribuir a su desarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFIA.

1. ADEGUNLOYE B. J. Y COLS. Sensitivity of rabbit aorta and mesenteric artery to norepinephrine: role of tyrosine kinases. *European Journal of Pharmacology* 2003; 476(3):201–209.
2. ALCÓN S. Y COLS. Activation of tyrosine kinase pathway by vanadate in gallbladder smooth muscle. *Biochemical Pharmacology* 2000; 59(9):1077–1089.
3. AJCC. Cancer Staging Manual, séptima edición publicado por Springer-Verlag. New York, 2010
4. AMAYA H., N. TANIGAWA, C. LU Y COLS., Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis, survival and thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression in human colorectal cancer. *Cancer Letters* 1997; 119 (2), 227–235.
5. ANDERSSON, K. Y COLS. A nitric oxide-mediated mechanism regulates lipolysis in human adipose tissue in vivo. *Br J Pharmacol* 1999; 126(7): 1639-1645.
6. ASANO-KATO N, FUKAGAWA K, OKADA N, KAWAKITA T, TAKANO Y, DOGRU M, TSUBOTA K, FUJISHIMA H. TGF-beta1, IL-1beta and Th2 cytokines stimulate vascular endothelial growth factor production from conjunctival fibroblasts. *Exp. Eye Res* 2005; 80:555–560.

7. ASTLER VB, COLLIER FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139:846-851.
8. BALKWILL, F. Y L.M. COUSSENS, Cancer: an inflammatory link. *Nature* 2004; 431(7007):405-406.
9. BARILLARI G, ALBONICI L, FRANZESE O, MODESTI A, LIBERATI F, BARILLARI P. The basic residues of placenta growth factor type 2 retrieve sequestered angiogenic factors into a soluble form: implications for tumor angiogenesis. *Am Pathol* 1998; 152:1161-66.
10. BASTERRA-GORTARI F. J. Y COLS. Tendencia creciente de la prevalencia de obesidad mórbida en España: de 1,8 a 6,1 por mil en 14 años *Rev Esp Cardiol* 2011; 64(5):424-6.
11. BATES DO, CUI TG, DOUGHTY JM, WINKLER M, SUGIONO M, SHIELDS JD, PEAT D, GILLATT D, HARPER SJ. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62:4123–4131.
12. BATES DO, MACMILLAN PP, MANJALY JG, QIU Y, HUDSON SJ, BEVAN HS, HUNTER AJ, SOOTHILL PW, READM, DONALDSON LF. Y COLS. The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGFxxx_b, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. *Clin. Sci* 2006; 110:575–585.

13. BENCKERT C, JONAS S, CRAMER T. Y COLS. Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2003; 63:1083.
14. BERNAARDS C, HEGDE P, CHEN D. Y COLS. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) as a biomarker for bevacizumab-based therapy in metastatic colorectal, non-small cell lung, and renal cell cancers: analysis of phase III studies. *J Clin Oncol* 2010; 28(15s):10519.
15. BERTRAND C. Y COLS. A gastrin precursor, gastrin-gly, upregulates VEGF expression in colonic epithelial cells through an HIF-1-independent mechanism. *Int J Cancer* 2010; 126(12): 2847–2857.
16. BROWNBILL P. Y COLS. Vasoactive and permeability effects of vascular endothelial growth factor-165 in the term in vitro dually perfused human placental lobule, *Endocrinology* 2007; 148 (10), 4734–4744.
17. CACERES JF, KORNBLIHTT AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 2002; 18:186–193.
18. CALLE, E.E. Y KAAKS R., Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(8):579-591.
19. CALVANI M, TRISCIUOGLIO D, BERGAMASCHI C, SHOEMAKER RH, MELILLO G. Differential involvement of vascular

- endothelial growth factor in the survival of hypoxic colon cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68(1):285–291.
20. CAO, Y. Y COLS. VEGF exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression. *Cancer Res* 20012; 72, 3912–3918.
21. CARMELIET P, COLLEN D. Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 902:249.
22. CARMELIET P, JAIN RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473:298.
23. CARMELIET P, JAN RK. Angiogenesis in cancer and others diseases. *Nature* 2000; 407:249-257.
24. CARMELIET P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9:653.
25. CARMELIET P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat. Med* 2000; 6:1102–1103.
26. CARMELIET, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 2005; 69(3):4–10.
27. CARMELIET, P. Y R.K. JAIN, Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407(6801):249-257.
28. CARR A. N. Y COLS. Tyrosine phosphatase inhibition augments collateral blood flow in a rat model of peripheral vascular disease,

- American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology 2004; 287(1) H268–H276.
29. CASTELLS A, MARZO M. Guía de práctica clínica. Prevención del cáncer colorrectal. SCM editores. Barcelona, 2004.
30. CATALÁN, V. Y COLS. Up-regulation of the novel proinflammatory adipokines lipocalin-2, chitinase-3 like-1 and osteopontin as well as angiogenic-related factors in visceral adipose tissue of patients with colon cancer. *J Nutr Biochem* 2011; 22(7):634-641.
31. CATENA R, LARZABAL L, LARRAYOZ M. Y COLS. VEGF121b and VEGF165b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. *Mol Cancer* 2010; 9:320.
32. CEBE SUAREZ S, PIEREN M, CARIOLATO L, ARN S, HOFFMANN U, BOGUCKI A, MANLIUS C, WOOD J, BALLMERHOFER K. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell. Mol. Life Sci* 2006; 63:2067–2077.
33. CHARNOCK-JONES DS, MACPHERSON AM, ARCHER DF, LESLIE S, MAKKINK WK, SHARKEY AM, SMITH SK. The effect of progestins on vascular endothelial growth factor, oestrogen receptor and progesterone receptor immunoreactivity and endothelial cell density in human endometrium. *Hum. Reprod* 2000; 15(Suppl. 3):85–95.
34. CHO, C.-H., Y COLS., Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circ Res* 2007; 100(4): e47-e57.

35. CHOI H, JUN M, JUNG G, KIM S, HONG S. Tumor angiogenesis as prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology* 1998; 55:575-581.
36. CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15(3): 532-4, 536-7.
37. CHOURA M Y REBA"Í A., Receptor tyrosine kinases: from biology to pathology, *Journal of Receptors and Signal Transductio* 2011; 31(6): 387–394.
38. CHRISTOFORIDIS E, KANELLOS I, TSACHALIS T, ANGELOPOULOS S, BLOUHOS K, BETSIS D. Is TNM classification related to early postoperative morbidity and mortality after colorectal cancer resections? *Test Coloproctol* 2004; 8:S89-S92.
39. CHUNG AS, FERRARA N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27:563.
40. CHUNG AS, LEE J, FERRARA N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:505.
41. COHEN CD, DORAN PP, BLATTNER SM, MERKLE M, WANG GQ, SCHMID H, MATHIESON PW, SALEEM MA, HENGER A, RASTALDI MP, ET AL. Sam68-like mammalian protein 2, identified by digital differential display as expressed by podocytes, is induced in

- proteinuria and involved in splice site selection of vascular endothelial growth factor. *J. Am. Soc. Nephrol* 2005; 16:1958–1965.
42. COOK KM, FIGG WD. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin* 2010; 60:222.
43. COOPER, MARK; DIMITRIA VRANES; SHERIF YOUSSEF; STEVEN A. STACKER; ALISON J. COX; BISHOY RIZKALLA; DAVID J. CASLEY; LEON A. BACH; DARREN J. KELLY; RICHARD E. GILBERT. Increased Renal Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor VEGFR-2 in Experimental Diabetes. *Diabetes* 1999; 48 (11):2229.
44. CUBO T, PARRILLA D, ORTEGA, RAMIA JM, PARDO R, MARTIN J. Biología molecular del proceso metastático del cáncer colorrectal. *Cir Esp* 2000; 68:577-87.
45. CURAT, C.A., Y COLS. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 2004; 53(5): 1285-1292.
46. DALY ME, MAKRIS A, REED M, LEWIS CE. Hemostatic regulators of tumor angiogenesis: a source of antiangiogenic agents for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1660.
47. DE VERGUEIRO LOBO, S.M., Y COLS., TNF-ALFA modulates statin effects on secretion and expression of MCP-1, PAI-1 and adiponectin in 3T3-L1 differentiated adipocytes. *Cytokine* 2012; 60(1): 150-156.

48. DELAGE, B. Y COLS. The effect of body weight on altered expression of nuclear receptors and cyclooxygenase-2 in human colorectal cancers. *Nutr J* 2007; 6:20.
49. DI SALVO J., PFITZER G. Y SEMENCHUK L. A., "Protein tyrosine phosphorylation, cellular Ca²⁺, and Ca²⁺ sensitivity for contraction of smoothmuscle," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1994; 72(11):1434–1439.
50. DIEZ M, POLLÁN M, RAMOS M, VILLET A, RATIA T, HERNANDEZ P, LOZANO O, NOGUERALES, GRANELL J. Variación del valor pronóstico de la proteína p53 en relación con el estadio tumoral en pacientes con adenocarcinoma colorrectal. *Cir Esp* 2005; 77(4):213-20.
51. DOWHAN DH, HONG EP, AUBOEUF D, DENNIS AP, WILSON MM, BERGET SM, O'MALLEY BW. Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta. *Mol. Cell* 2005; 17:429–439.
52. DUBOIS, R.N. Y COLS. The nuclear eicosanoid receptor, PPARgamma, is aberrantly expressed in colonic cancers. *Carcinogenesis* 1998; 19(1):49-53.
53. DUKES CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932; 35:323-332.

54. DWORZANSKI, T. Y COLS. Influence of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) agonist, rosiglitazone and antagonist, biphenol-A-diglycidyl ether (BADGE) on the course of inflammation in the experimental model of colitis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2010; 61(6): p. 683-93.
55. DYMICKA-PIEKARSKA V., GUZINSKA-USTYMOWICZ K., KUKLINSKI A. Y KEMONA H., Prognostic significance of adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and VEGF in colorectal cancer patients. *Thrombosis Research* 2012; 129(4): e47–e50.
56. ELBERG G., J. LI, A. LEIBOVITCH, Y Y. SHECHTER, Non-receptor cytosolic protein tyrosine kinases from various rat tissues, *Biochimica et Biophysica Acta* 1995; 1269(3):299–306.
57. ELICEIRI BP., PAUL R., SCHWARTZBERG PL. Y COLS. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 1999; 4:915.
58. ELLIS LM, HICKLIN DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:579.
59. FAIN, J.N. Y COLS., Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004; 145(5):2273-2282.
60. FAN F, WEY JS, MCCARTY MF, BELCHEVA A, LIU W, BAUER TW, SOMCIO RJ, WU Y, HOOPER A, HICKLIN DJ, ELLIS LM.

Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor 1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* 2005; 24(16):2647–2653.

61. FERLAY J, AUTIER P, BONIOL M, COLOMBET M, BOYLE P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology* 2007; 18(3): 581-592.
62. FERNANDEZ N Y COLS. Cerebral vasoconstriction produced by vasopressin in conscious goats: role of vasopressin V1 and V2 receptors and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol* 2001; 132: 1837-1844.
63. FERNANDEZ N Y COLS. In vivo coronary effects of endothelin-1 after ischemia–reperfusion. Role of nitric oxide and prostanoids. *Eur. J Pharmacol* 2003; 481: 109-117.
64. FERNANDEZ N Y COLS. Role of nitric oxide in vascular tone and in reactivity to isoproterenol and adenosine in the goat coronary circulation. *Eur. J. Pharmacol* 2000; 387: 93-99.
65. FERRARA N, CARVER-MOORE K, CHEN H. Y COLS. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380:439.
66. FERRARA N, GERBER HP, LECOUTER J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669.

67. FERRARA N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 2004; 25 (4):581– 611.
68. FERRERO E., GARCÍA VILLALON A.L., LABALDE M., DIEGUEZ G., HIDALGO M. Efecto de la endotelina-1 sobre las arterias tumorales de pacientes con neoplasia colorectal. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 2008; 100 (6):327-331.
69. FERRERO E, GARCÍA VILLALÓN AL, LABALDE M, DIÉGUEZ G, HIDALGO M. Efectos de la triiodotironina sobre la vasoconstricción adrenérgica en arterias tiroideas humanas. *Cir Esp* 2006; 80:16-17.
70. FERRERO E, LABALDE M, GARCÍA VILLALÓN AL, DIÉGUEZ G, HIDALGO M. Techniques for the dissection and isolation of human mesenteric arteries to analyze vascular response to endothelin-1 in arteries from colorectal tumours. In: 16th World Congress of the International Association of Surgeons and Gastroenterologists Jarpyo Ed. Madrid, 2007.
71. FERRERO E., MAURICIO M.D., GRANADO M., GARCÍA-VILLAR O., ALDASORO M., VILA J.M., HIDALGO M., FERRERO J.L., FERNANDEZ N., MONGE L., GARCIA-VILLALON A.L. Tyrosine phosphorylation modulates the vascular responses of mesenteric arteries from human colorectal tumors. *BioMed Research International* (Manuscript has been accepted for publication in the journal.) 2013; Article ID 545983 Ref. Article 545983.

72. FERRERO E. Y COLS. Response to endothelin-1 in arteries from human colorectal tumours: role of endothelin receptors. *Experimental Biology and Medicine* 2008; 233(12):1602–1607.
73. FERRUCHI JT. Colon Cancer Screening with virtual colonoscopy: promise, polyps, politics. *AJR Am J Roentgenol* 2001; 177:975-988.
74. FETSCHER C. Y COLS. Modulation of noradrenaline-induced microvascular constriction by protein kinase inhibitors, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2001; 363(1):57–65.
75. FINLEY S. Y POPEL AS. Effect of Tumor Microenvironment on Tumor VEGF during Anti-VEGF Treatment: Systems Biology Predictions. *J Natl Cancer Inst* 2013; 105(11): 802–811.
76. FINLEY SD, POPEL AS. Predicting the effects of anti-angiogenic agents targeting specific VEGF isoforms. *AAPS J* 2012; 14(3):500–509.
77. FLEGAL KM, CARROLL MD, OGDEN CL, CURTIN LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* 2010; 303:235-41.
78. FOLKMAN J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 29:15.
79. FONTANA, L. Y COLS. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 2007; 56(4):1010-1013.

80. FRANCO-PONS, N., GEA-SORLÍ S. Y CLOSA D. Release of inflammatory mediators by adipose tissue during acute pancreatitis. *J Pathol* 2010; 221(2):175-182.
81. FREEDMAN DS Y COLS. Trends and correlates of class 3 obesity in the United States from 1990 through 2000. *JAMA* 2002; 288:1758-61.
82. FREZZA, E.E., M.S. WACHTEL, Y M. CHIRIVA-INTERNATI, Influence of obesity on the risk of developing colon cancer. *Gut* 2006. 55(2):285-291.
83. FRIED, S.K., BUNKIN D.A. Y GREENBERG A.S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(3):847-850.
84. FUKUMURA D Y COLS. Role of nitric oxide in tumor microcirculation. Blood flow, vascular permeability, and leukocyte-endothelial interactions. *Am J Pathol* 1997; 150(2):713-25.
85. FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.
86. FURSPAN P. B. Y COLS. Cooling-induced contraction and protein tyrosine kinase activity of isolated arterioles in secondary Raynaud's phenomenon. *Rheumatology* 2005; 44 (4):488–494.

87. GALE NW, YANCOPOULOS GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 1999; 13:1055.
88. GALLEY HF, WEBSTER NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesthesia* 2004; 93:105-113.
89. GANONG W. Dinámica del flujo de la sangre y la linfa. En: *Fisiología médica. El Manual Moderno* ed. 2006; p-543.
90. GARCÍA AGUILAR J, GUERRERO VH. Pólipos, poliposis y cáncer colorrectal. En: *Cirugía AEC. Manual de la Asociación Española de Cirujanos*. Panamericana. 2005.
91. GARCÍA VILLALÓN AL, FERRERO E, LABALDE M, HIDALGO M, DIÉGUEZ G. Contraction of human arteries from colorrectal tumours to endothelin-1. *Hepatogastroenterology* 2006; 53:216.
92. GARCÍA-VILLALÓN AL Y COLS. Effects of vasopressin on the sympathetic contraction of rabbit ear artery during cooling. *Br. J. Pharmacol* 1999; 126: 785-793.
93. GARCÍA-VILLALÓN AL Y COLS. Impaired potentiation by endothelin-1 and vasopressin of sympathetic contraction in tail artery from hypertensive rats. *Cardiovasc. Res* 2000; 45: 463-469.

94. GARCÍA-VILLALÓN AL Y COLS. Vascular reactivity to vasopressin during diabetes: gender and regional differences. Eur. J. Pharmacol 2003; 459: 247-254.
95. GARCÍA-VILLALÓN AL Y COLS. Urocortin protects coronary endothelial function during ischemia-reperfusion: a brief communication. Exp. Biol. Med. 2004; 229: 118-120.
96. GARCÍA VILLAR O., FERRERO E. Y COLS. Relajación al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en arterias de tumores colorrectales. Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid. Cir Esp. Esp.Congreso_2 Noviembre 2010 XXVIII Congreso Nacional de Cirugía 2010; 88:171-172
97. GHOSH S. Y COLS. High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer.Hum Pathol 2008; 39:1835–1843.
98. GIMBLE, J.M. Y COLS. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. Mol Pharmacol 1996; 50(5):1087-94.
99. GIOVANNUCCI, E., Y COLS. Physical activity, obesity, and risk of colorectal adenoma in women (United States). Cancer Causes Control 1996; 7(2):253-263.

100. GOAD DL, RUBIN J, WANG H, TASHJIAN AH JR, PATTERSON C. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulinlike growth factor I. *Endocrinology* 1996; 137:2262–2268.
101. GOEL H., MERCURIO A. VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews Cancer* 2013; 13:871–882.
102. GRANADO, M. Y COLS. Cyclooxygenase-2 inhibition reverts the decrease in adiponectin levels and attenuates the loss of white adipose tissue during chronic inflammation. *Eur J Pharmacol* 2009; 608(1-3):97-103.
103. GRASA L. Y COLS., The role of tyrosine kinase in prostaglandin E2 and vanadate-evoked contractions in rabbit duodenum in vitro, *Journal of Physiology and Pharmacology* 2006; 57(2):279–289.
104. GRIVENNIKOV, S.I. Y KARIN M., Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Ann Rheum Dis* 2011; 70(S1):i104-i108.
105. GROWTH. *Cancers (Basel)* 2014; 6(4):2330-42.
106. GUBA M, SEELIGER H, KLEESPIES A, JAUCH KW, BRUNS C. Vascular endothelial growth factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19:510–7.

107. GUDE, M.F. Y COLS. The production and regulation of IGF and IGFBPs in human adipose tissue cultures. *Growth Horm IGF Res* 2012; 22(6):200-5.
108. HAGBERG CE, MEHLEM A, FALKEVALL A, ET AL. Targeting VEGF-B as a novel treatment for insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490:426.
109. HARADA Y., OGATA Y. Y SHIROUZU K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptorKDR (kinase domaincontaining receptor)/Flk-1 (fetal liver kinase-1) as prognostic factors in human colorectal cancer. *International Journal of Clinical Oncology* 2001; 6(5):221–228.
110. HARVEY, A.E., LASHINGER L.M., Y HURSTING S.D., The growing challenge of obesity and cancer: an inflammatory issue. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1229:45-52.
111. HAUNER, H., Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc Nutr Soc* 2005; 64(2):163-169.
112. HE H. Y COLS. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through Flk-1/KDR activation of c-Src, *TheJournal of Biological Chemistry* 1999; 274(35):25130–25135.
113. HEATH VL, BICKNELL R. Anticancer strategies involving the vasculature. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6:395.

114. HERMAN AG, MONCADA S, VANE JR. Formation of prostacyclin (PGI₂) by different layers of the arterial wall. Arch Int Pharmacodyn 1997; 227:162-3.
115. HICKLIN DJ, ELLIS LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol 2005; 23:1011.
116. HIDA J, OKUNO K, YASUTOMI M, YOSHIFUJI T, MATSUZAKI T, UCHIDA T, ISHIMARU E, TOKORO T, SHIOZAKI H. Number versus distribution in classifying regional lymph node metastases from colon cancer. J Am Coll Surg 2005; 201(2):217-22.
117. HILLENBRAND, A. Y COLS. Changed adipocytokine concentrations in colorectal tumor patients and morbidly obese patients compared to healthy controls. BMC Cancer 2012; 12:545.
118. HIRATA A, OGAWA S, KOMETANI T. Y COLS. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Cancer Res 2002; 62:2554.
119. HISAYAMA T. Y COLS. Tyrosine kinase may participate in Ca²⁺ entry for endothelial nitric oxide production, Japanese Journal of Pharmacology 1995; 67(2):181–183.
120. HOOPER A, HICKLIN DJ, ELLIS LM. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor 1 on human colorectal cancer cells. Oncogene 2005; 24(16):2647–2653.

121. HUANG H. Y COLS., Expression of VEGF and its receptors in different brain tumors, *Neurological Research* 2005; 27(4):371–377.
122. HUBBARD, M. J., Y COHEN, P. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *TIBS* 1993; 18:172-177.
123. HUBBARD, S. R., Y TILL, J. H. Protein tyrosine kinase structure y function. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:373-398.
124. HUNTER T., The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease, *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 1998; 353(1368):583–605.
125. HURSTING, S.D., Y COL., The obesity-cancer link: lessons learned from a fatless mouse. *Cancer Res* 2007; 67(6):2391-3.
126. JACOBS E. R. Y COLS. VEGF-induced relaxation of pulmonary arteries is mediated by endothelial cytochrome P-450 hydroxylase, *American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology* 2006; 291(3):L369–L377.
127. JUBB AM, MILLER KD, RUGO HS. Y COLS., Impact of exploratory biomarkers on the treatment effect of bevacizumab in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17(2):372–381.
128. KAFL H. E. Y ELKASHEF H. A., Effect of sodium orthovanadate on the urinary bladder rings isolated from normal and hyperglycemic rats, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 19(3):195–201.

129. KALNINA Z, ZAYAKIN P, SILINA K, LINE A. Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 42:342–357.
130. KARLSSON H, FRYKNÄS M, LARSSON R, NYGREN P. Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. *Exp Cell Res* 2012; 318(13):1577–1585.
131. KHAN, N., F. AFAQ, Y H. MUKHTAR, Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett* 2010; 293(2):133-143.
132. KHOSRAVI SHAHI P., DEL CASTILLO RUEDA A., PÉREZ MANGA G. Angiogénesis neoplásica. *AN. MED. INTERNA* 2008; 25(7):366-369.
133. KITAZONO T., IBAYASHI S., NAGAO T., FUJII K., KAGIYAMA T., Y FUJISHIMA M., Role of tyrosine kinase in dilator responses of rat basilar artery in vivo. *Hypertension* 1998; 31(3):861–865.
134. KLOPP, A.H. Y COLS. Omental adipose tissue-derived stromal cells promote vascularization and growth of endometrial tumors. *Clin Cancer Res* 2012; 18(3):771-82.
135. KOCH, S. & CLAESSION-WELSH, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Med* 2012; 2:a006502.

136. KONOPATSKAYA O, CHURCHILL AJ, HARPER SJ, BATES DO, GARDINER TA. VEGF165b, an endogenous C terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. *Mol. Vis* 2006; 12:626–632.
137. KORNBLIHTT AR. Promoter usage and alternative splicing. *Curr. Opin. Cell Biol* 2005; 17:262–268.
138. KOWANETZ, M. & FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin. Cancer Res* 2006; 12:5018–5022.
139. KU DD, ZALESKI JK, LIU S, BROCK TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation of coronary arteries. *Am J Physiol* 1993; 265(2 Pt 2):H586-592.
140. KUWAI T, KITADAI Y, TANAKA S Y COLS. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 105:176.
141. LABALDE M., FERRERO E., G^a VILLALÓN A.L., DIÉGUEZ G., HIDALGO M. Endothelin-1 effects on human arteries that irrigate colorectal tumours. En Libro: I.A.S.G. 16th. World Congreso of the Internacional Association of Surgeons & Gastroenterologists. Jarpyo Editores, S.A. ISBN: 978-84-96549-48-7. M-24.706-2007. 2006; 177-178.
142. LABALDE M., FERRERO E., G^a VILLALÓN A.L., DIÉGUEZ G., ALONSO J., HIDALGO M. Liberación de óxido nítrico en arterias

- tumorales de pacientes con cáncer colorectal. *Revista Española de Investigaciones Quirúrgicas* 2010; XIII(4):154-158.
143. LABALDE M. Respuesta a la endotelina-1 en arterias humanas de tumors de colon y recto. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid. 2008.
144. LAN K-L, OU-YANG F, YEN S-H, SHIH H-L, LAN K-H. Cationic liposome coupled endostatin gene for treatment of peritoneal colon cancer. *Clin Exp Metastasis* 2010; 27(5):307–318.
145. LARSEN WJ., Human embriology England. Churchill Livingstone 1993; 167-204.
146. LEBLANC A. J. Y COLS., Age impairs Flk-1 signaling and NO-mediated vasodilation in coronary arterioles. *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology* 2008; 295(6):H2280–H2288.
147. LEE, W.M., Y COLS., Susceptibility of lean and obese Zucker rats to tumorigenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Lett* 2001; 162(2):155-160.
148. LEFEBVRE, A.M. Y COLS. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med* 1998; 4(9):1053-1057.

149. LEME M, WAITZBERG A, NETO R, LINHARES M, MATOS D. Assessment of angiogenesis expresion and its relationship with prognosis of colorectal cancer by conventional and computer-assisted histopathological image analysis. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2006; 21:392-397.
150. LEVY NS, CHUNG S, FURNEAUX H, LEVY AP. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 1998; 273:6417.
151. LI B. Y COLS. KDR (VEGF receptor 2) is the major mediator for the hypotensive effect of VEGF. *Hypertension* 2002; 39(6):1095–1100.
152. LI H, YONEKURA H, KIM CH, SAKURAI S, YAMAMOTO Y, TAKIYA T, FUTO S, WATANABE T, YAMAMOTO H. Possible participation of pICln in the regulation of angiogenesis through alternative splicing of vascular endothelial growth factor receptor mRNAs. *Endothelium* 2004; 11:293–300.
153. LI, X. Y COLS. Steroid effects on osteogenesis through mesenchymal cell gene expression. *Osteoporos Int* 2005; 16(1):101-108.
154. LIJNEN, H.R., Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res* 2008; 78(2):286-293.
155. LIJNEN, H.R., Y COLS., Impaired adipose tissue development in mice with inactivation of placental growth factor function. *Diabetes* 2006; 55(10):2698-2704.

156. LIU C. Y COLS. Role of tyrosine phosphorylation in U46619-induced vasoconstriction of pulmonary vasculature and its modulation by genistein, daidzein, and equol, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2007; 50(4):441–448.
157. LIU M.H. Y COLS. Vascular endothelial growth factor-mediated, endotheliumdependent relaxation in human internal mammary artery, *Annals of Thoracic Surgery* 2002; 73(83):819-824.
158. LIVAK, K.J. Y SCHMITTGEN T.D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* 2001; 25(4):402-408.
159. LJUNGBERG B. J. Y COLS. Different vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-receptor 1 and -2 mRNA expression profiles between clear cell and papillary renal cell carcinoma. *BJU International* 2006; 98(3):661–667.
160. LLEDÓ S. Cirugía colorrectal. Guía clínica de la Asociación Española de Cirujanos. Aran, 2000.
161. LLORENS S, JORDAN J, NAVA E. The nitric oxide pathway in the cardiovascular system. *Physiol Biochem* 2002; 58:179-88.
162. LOGES S, MAZZONE M, HOHENSINNER P. Y CARMELIET P. Silencing of fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited. *Cancer Cell* 2009; 15(3):167–170.

163. LUMENG, C.N. Y COLS. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 2007; 56(1):16-23.
164. LYNCH HT, SHAW TG, LYNCH JF. Inherited predisposition to cancer: a historical overview. *Am J Med Genet* 2004; 129:5-22.
165. MADHUSUDAN S. Y T. S. GANESAN, Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy, *Clinical Biochemistry* 2004; 37(7):618– 635.
166. MAI, V., Y COLS, Calorie restriction and diet composition modulate spontaneous intestinal tumorigenesis in APC (Min) mice through different mechanisms. *Cancer Res* 2003; 63(8):1752-1755.
167. MANNING, G., WHYTE, D. B., MARTINEZ, R., HUNTER, T., Y SUDARSANAM, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002; 298:1912-1934.
168. MASUI H. Y WAKABAYASHI I. Tyrosine phosphorylation increases Ca²⁺ sensitivity of vascular smooth muscle contraction, *Life Sciences* 2000; 68(4)363–372.
169. MATLIN AJ, CLARK F, SMITH CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* 2005; 6:386–398.
170. MAXWELL PH, PUGH CW, RATCLIFFE PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11:293.

171. MCARDLE, M.A., Y COLS. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4:52.
172. MCCARTY MF, BIELENBERG D, DONAWHO C. Y COLS. Evidence for the causal role of endogenous interferon-alpha/beta in the regulation of angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis of cutaneous neoplasms. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19:609.
173. MEHNERT J. M. Y COLS. "Quantitative expression of VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, and VEGF-R3 in melanoma tissue microarrays," *Human Pathology* 2010; 41(3):375–384.
174. METAIS C. Y COLS. "Effects of coronary artery disease on expression and microvascular response to VEGF," *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology* 1998; 275(4):H1411–H1418.
175. MIRANDA, K.M., ESPEY M.G. Y WINK D.A., A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide-Biol Ch* 2001; 5(1):62-71
176. MISTELI T, CACERES JF, SPECTOR DL. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 1997; 387:523–527.
177. MIZUKAMI Y, KOHGO Y, CHUNG DC. Hypoxia inducible factor-1 independent pathways in tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2007; 13:5670.

178. MÜHLHAUSER J, PILI R, MERRILL MJ. Y COLS. In vivo angiogenesis induced by recombinant adenovirus vectors coding either for secreted or nonsecreted forms of acidic fibroblast growth factor. *Hum Gene Ther* 1995; 6:1457.
179. MUKHOPADHYAY D, TSIOKAS L, ZHOU XM, FOSTER D, BRUGGE JS, SUKHATME VP. Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* 1995; 375:577–581.
180. MULLE J. M. Y COLS., Coronary arteriolar flow-induced vasodilation signals through tyrosine kinase, *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology* 1996; 270(6(2)):H1878–H1884.
181. NAGY JA, CHANG SH, DVORAK AM, DVORAK HF. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br J Cancer* 2009; 100:865.
182. NAKAIKE R. Y COLS. Vanadate causes synthesis of endothelium-derived NO via pertussis toxin- sensitive G protein in pigs, *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology* 1996; 271(1(2)):H296–H302.
183. NAKARAI, H., Y COLS., Adipocyte-macrophage interaction may mediate LPS-induced low-grade inflammation: potential link with metabolic complications. *Innate Immun* 2012; 18(1):164-170.

184. NEUFELD G, COHEN T, GENGRINOVITCH S, POLTORAK Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999; 13:9–22.
185. NEUFELD G, KESSLER O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:632.
186. NEUFELD G. Y COLS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, *FASEB J* 1999; 13(1):9–22.
187. NOMURA T. Y COLS. Altered response to histamine in brain tumor vessels: the selective increase of regional cerebral blood flow in transplanted rat brain tumor. *J Neurosurg* 1996; 79(5): 722-728.
188. NOTARNICOLA, M. Y COLS. Low levels of lipogenic enzymes in peritumoral adipose tissue of colorectal cancer patients. *Lipids* 2012; 47(1):59-63.
189. O'CONNOR, J.C. Y COLS. Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: at the interface of immunology and endocrinology. *Cell Immunol* 2008; 252(1-2):91-110.
190. OKITA N.T. Y COLS. Vascular endothelial growth factor receptor expression as a prognostic marker for survival in colorectal cancer, *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2009; 39(9):595–600.

191. OLSSON A.-K., A. DIMBERG, J. KREUGER, Y L. CLAEISSON-WELSH, VEGF receptor signalling—in control of vascular function, *Nature ReviewsMolecular Cell Biology* 2006; 7(5)359–371.
192. ONCOSUR: GRUPO DE TRABAJO ONCOLÓGICO DE CENTROS HOSPITALARIOS DEL SUR DE MADRID. Guía clínica de diagnóstico y tratamiento del cáncer colorrectal. Fundación Médica Mutua Madrileña editores. Madrid, 2007
193. ORTIZ MELÓN, JM. Proteína quinasas como dianas farmacológicas. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XXIV. 2009
194. OSHIKAWA J. Y COLS. Extracellular SODderived H₂O₂ promotes VEGF signaling in caveolae/lipid rafts and post-ischemic angiogenesis in mice, *PLoS ONE* 2010; 5(4):e10189.
195. PALLARES J. Y COLS. “Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues,” *Histology and Histopathology* 2006; 21(8):857–865.
196. PAN Q, ET AL. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 2007; 11:53–67.
197. PANIGRAHY, D. Y COLS. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest* 2002; 110(7):923-932.

198. PAPI, A. Y COLS. RXRgamma and PPARgamma ligands in combination to inhibit proliferation and invasiveness in colon cancer cells. *Cancer Lett* 2010; 297(1):65-74.
199. PARK, J., D.M. EUHUS, Y P.E. SCHERER, Paracrine and endocrine effects of adipose tissue on cancer development and progression. *Endocr Rev* 2011; 32(4):550-570.
200. PEPPER MS, MONTESANO R. Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Differ Dev* 1990; 32:319.
201. PEREA GARCÍA J. Caracterización clínica, molecular e inmunofenotípica del cáncer colorrectal en pacientes menores de 45 años en la provincia de Segovia. *Obra Social y Cultural de Caja Segovia*, 2007
202. PERRIN RM, KONOPATSKAYA O, QIU Y, HARPER S, BATES DO, CHURCHILL AJ. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia* 2005; 48:2422–2427.
203. PETERSON G. L., A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable, *Analytical Biochemistry* 1997; 83(2):346–356.
204. PETERSON, J.E. Y COLS. VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. *Angiogenesis* 2012; 15(2):265-273.

205. PORE N, LIU S, HAAS-KOGAN DA, Y COLS. PTEN mutation and epidermal growth factor receptor activation regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human glioblastoma cells by transactivating the proximal VEGF promoter. *Cancer Res* 2003; 63:236.
206. PRAGER GW, BREUSS JM, STEURER S, Y COLS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood* 2004; 103:955.
207. PUGH CW, RATCLIFFE PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003; 9:677.
208. QIU Y, BEVAN H, WEERAPERUMA S, WRATTING D, MURPHY D, NEAL CR, BATES DO, HARPER SJ. Mammary alveolar development during lactation is inhibited by the endogenous antiangiogenic growth factor isoform, VEGF165b. *FASEB J* 2007; 22:1104–1112.
209. RAK J, MITSUHASHI Y, BAYKO L, FILMUS J, SHIRASAWA S, SASAZUKI T, KERBEL RS. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995; 55:4575–4580.
210. RAVINDRANATH N, WION D, BRACHET P, DJAKIEW D. Epidermal growth factor modulates the expression of vascular endothelial growth factor in the human prostate. *J Androl* 2001; 22:432.
211. REHMAN, J., Y COLS., Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109(10):1292-1298.

212. RENNEL ES, HARPER SJ, BATES DO. Therapeutic potential of manipulating VEGF splice isoforms in oncology. *Future Oncol* 2009; 5(5):703–712.
213. REUBI J. C. Y COLS. Concomitant vascular GRP-receptor and VEGF-receptor expression in human tumors: molecular basis for dual targeting of tumoral vasculature, *Peptides* 2011; 32(7):1457–1462.
214. RICCI AG, OLIVARES CN, BIOLOTAS MA, MERESMAN GF, BARANAO RI. Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis. *Reprod Sci* 2011; 18(7):614–622.
215. RIFKIN DB, MOSCATELLI D, BIZIK J. Y COLS. Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differ Dev* 1990; 32:313.
216. ROSE G. Sick individuals and sick populations. *Int J Epidemiol* 2001; 30:427-32.
217. SADLER TW. *Langman's medical embryology*. 10th edition. Lippincott Williams and Wilkins, 2006
218. SALCEDO A. Estudio in vitro del estado funcional del endotelio de las arterias esplácnicas de pacientes con insuficiencia hepática terminal. Papel de los radicales libres de oxígeno. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid, 2007
219. SANTRY HP, GILLEN DL, LAUDERDALE DS. Trends in bariatric surgical procedures. *JAMA* 2005; 294:1909-17.

220. SANZ E Y COLS. Mechanisms of relaxation by urocortin in renal arteries from male and female rats. *Br. J. Pharmacol* 2003 ; 140:1003-1007.
221. SARTELET H. Y COLS. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (VEGF-R1 [Flt-1] and VEGF-R2 [KDR/Flk-1]) in tumorlets and in neuroendocrine cell hyperplasia of the lung, *Human Pathology* 2004; 35(10):1210–1217.
222. SCHAFFLER, A. Y COLS. Vascular endothelial growth factor secretion from mesenteric adipose tissue and from creeping fat in Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(9):1419-23.
223. SCHMIDT M. Y COLS. Expression of VEGFR-1 (Flt-1) in breast cancer is associated with VEGF expression and with node-negative tumour stage, *Anticancer Research, 8 BioMed Research International* 2008; 28(3):1719–1724.
224. SCHUMACHER VA, JERUSCHKE S, EITNER F, BECKER JU, PITSCHKE G, INCE Y, MINER JH, LEUSCHNER I, ENGERS R, EVERDING AS, Y COLS. Impaired glomerular maturation and lack of VEGF165b in Denys-Drash syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol* 2007; 18:719–729.
225. SEAMAN S, STEVENS J, YANG MY, Y COLS. Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell* 2007; 11:539.

226. SELLKE F.W. Y COLS. Enhanced microvascular relaxations to VEGF and bFGF in chronically ischemic porcine myocardium, *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology* 1996; 271(2):H713–H720.
227. SENGGER, D. R. & VAN DE WATER, L. VEGF expression by epithelial and stromal cell compartments: resolving a controversy. *Am. J. Pathol* 2000; 157:1–3.
228. SENGGER, DR. Vascular endothelial growth factor: much more than an angiogenesis factor. *Mol. Biol. Cell* 2010; 21:377–379.
229. SHAH D. I. Y SINGH M., Inhibition of protein tyrosin phosphatase improves vascular endothelial dysfunction, *Vascular Pharmacology* 2006; 44(3):177–182.
230. SHARMA S. Y COLS Mechanism of attenuation of diabetes mellitus and hypercholesterolemia induced vascular endothelial dysfunction by protein tyrosine phosphatase inhibition, *Vascular Pharmacology* 2011; 54(3–6)80–87.
231. SHARMA, A.M. Y STAELS B. Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(2):386-395.
232. SHWEIKI D, ITIN A, SOFFER D, KESHET E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359:843–845.

233. SILHA, J.V. Y COLS. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29(11):1308-1314.
234. SMITH CW. Alternative splicing - when two's a crowd. *Cell* 2005; 123:1–3.
235. SMITH N. R., D. BAKER, N. H. JAMES Y COLS., Vascular endothelial growth factor receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 are localized primarily to the vasculature in human primary solid cancers, *Clinical Cancer Research* 2010; 16(14):3548–3561.
236. SONE H, KAWAKAMI Y, OKUDA Y, KONDO S, HANATANI M, SUZUKI H, YAMASHITA K. Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1996; 221:193–198.
237. STAGG BC, UEHARA H ET AL. Morpholino-Mediated Isoform Modulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR2) Reduces Colon Cancer Xenograft Growth *Cancers* 2014; 6(4):2330-2342.
238. STEFANINI MO, WU FTH, MAC GABHANN F, POPEL AS. Increase of plasma VEGF after intravenous administration of bevacizumab is predicted by a pharmacokinetic model. *Cancer Res* 2010; 70(23):9886–9894.

239. STUTTFELD E. Y K. BALLMER-HOFER, "Structure and function of VEGF receptors," IUBMB Life 2009; 61(9):915–922.
240. SUCHTING S, EICHMANN A. Jagged gives endothelial tip cells an edge. Cell 2009; 137:988.
241. SUGANO M. Y COLS. A protein tyrosine phosphatase inhibitor accelerates angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia, Journal of Cardiovascular Pharmacology 2004; 44(4):460–465.
242. SUGIYAMA, M. Y COLS. Adiponectin inhibits colorectal cancer cell growth through the AMPK/mTOR pathway. Int J Oncol 2009; 34(2):339-344.
243. SUZUKI M Y COLS. Medial regression and its functional significance in tumor-supplying host arteries. A morphometric study of hepatic arteries in human livers with hepatocellular carcinoma. Cancer 1987; 59(3): 444-50.
244. SUZUKI M Y COLS. Functional characteristics of tumor vessels: selective increase in tumor blood flow. Sci Rep Res Inst Tohoku Univ 1989; 36(1-4):37-45.
245. TAKAHASHI H. Y SHIBUYA M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. Clinical Science 2005; 109(3):227–241.
246. TAKAHASHI Y, BUCANA CD, CLEARY KR, ELLIS LM. p53, vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. Int J Cancer 1998; 79:34.

247. TAKAYAMA T, MIYANISHI K, HAYASHI T, SATO Y, NITSU Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol* 2006; 41:185-192.
248. TAMMELA T, ZARKADA G, WALLGARD E, ET AL. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 2008; 454:656.
249. TASAKI K. Y COLS. Difference in signal transduction mechanisms involved in 5-hydroxytryptamine- and U46619-induced vasoconstrictions, *Journal of Smooth Muscle Research* 2003; 39(5):107–117.
250. TOLNAY E, KUHNEN C, WIETHEGE T, ET AL. Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor c-Met are overexpressed and associated with an increased microvessel density in malignant pleural mesothelioma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124:291.
251. TOSATO G. Interferon-alpha is implicated in the transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:420.
252. TOZER GM Y COLS. Inhibition of Nitric Oxide Synthase Induces a Selective Reduction in Tumor Blood Flow That Is Reversible with L-Arginine. *Cancer Res* 1997; 57(5): 948-55.
253. TOZER GM, KANTHOU C, BAGULEY BC. Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:423.

254. UZUN O. Y A. T.DEMIRY"UREK, Involvement of tyrosine kinase pathway in acute hypoxic vasoconstriction in sheep isolated pulmonary vein. *Vascular Pharmacology* 2003; 40(3):175–181.
255. VARDA-BLOOM N, SHAISH A, GONEN A, LEVANON K, GREENBEREGER S, FERBER S, LEVKOVITZ H, CASTEL D, GOLDBERG I, AFEK A, KOPOLOVITC Y, HARATS D. Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. *Gene Therapy* 2001; 8:819-827.
256. VAREY AH, RENNEL ES, QIU Y, BEVAN HS, PERRIN RM, RAFFY S, DIXON AR, PARASKEVA C, ZACCHEO O, HASSAN AB, ET AL. VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br. J. Cancer* 2008; 98:1366–1379.
257. VILLALBA N., A. KUN, E. STANKEVICIUS, Y U. SIMONSEN, Role for tyrosine kinases in contraction of rat penile small arteries, *Journal of Sexual Medicine* 2010; 7(6):2086–2095.
258. VON MARSCHALL Z, SCHOLZ A, CRAMER T, ET AL. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:437.
259. WAGNER, M. Y COLS. Inflamed tumor-associated adipose tissue is a depot for macrophages that stimulate tumor growth and angiogenesis. *Angiogenesis* 2012; 15(3):481-495.

260. WALDNER, M. J. ET AL. VEGF receptor signaling links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *J. Exp. Med* 2010; 207, 2855–2868.
261. WANG D., DONNER D. B. Y WARREN R. S., Homeostatic modulation of cell surface KDR and Flt1 expression and expression of the vascular endothelial cell growth factor (VEGF) receptor mRNAs by VEGF, *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(21):15905–15911.
262. WATANABE M. Y COLS. Modulatory role of protein tyrosine kinase activation in the receptor-induced contractions of the bovine cerebral artery, *Neurologia Medico-Chirurgica* 1998; 38(2):75–82.
263. WEI K, PIECEWICZ SM, MCGINNIS LM, ET AL. A liver Hif-2 α -Irs2 pathway sensitizes hepatic insulin signaling and is modulated by Vegf inhibition. *Nat Med* 2013; 19:1331.
264. WEI W. Y COLS. Vascular endothelial growth factor-induced nitric oxide-and PGI₂-dependent relaxation in human internal mammary arteries: a comparative study with KDR and Flt-1 selective mutants, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2004; 44(5):615–621.
265. WEI W. Y COLS. Vasorelaxation induced by vascular endothelial growth factor in the human internal mammary artery and radial artery, *Vascular Pharmacology* 2007; 46(4):253–259.
266. WELLEN, K.E. Y G.S. HOTAMISLIGIL, Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115(5):1111-1119.

267. WIGGERS T, JEEKEL J, ARENDS JN. No touch isolation technic in colon cancer: a controlled prospective trial. *Br J Surg* 1988; 75:409-415.
268. WIJETUNGE S. Y COLS. Tyrosine kinase inhibitors block calcium channel currents in vascular smooth muscle cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992; 189(3):1620–1623.
269. WIN, A.K., Y COLS. Risk prediction models for colorectal cancer: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21(3):398-410.
270. WOOLARD J, WANG WY, BEVAN HS, QIU Y, MORBIDELLI L, PRITCHARD-JONES RO, CUI TG, SUGIONO M, WAINE E, PERRIN R, Y COLS. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004; 64:7822–7835.
271. XU H. Y COLS. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112(12):1821-1830.
272. YAEGASHI H Y COLS. Encasement and other deformations of tumor-embedded host arteries due to loss of medial smooth muscles. Morphometric and three-dimensional reconstruction studies on some human carcinomas. *Cancer* 1990; 65(5): 1097-103.
273. YAMAGISHI N., TESHIMA-KONDO S. Y COLS. Chronic inhibition of tumor cell-derived VEGF enhances the malignant phenotype of colorectal cancer cells. *BMC Cancer* 2013; 13: 229.

274. YAN M, CALLAHAN CA, BEYER JC, Y COLS. Chronic DLL4 blockade induces vascular neoplasms. *Nature* 2010; 463:E6.
275. YANG R. THOMAS GR, BUNTING S, KO A, FERRARA N, KEYT B, ROSS J, JIN H Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27(6):838-44.
276. YE, J. Regulation of PPARgamma function by TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374(3):405-408.
277. YE, J. Y GIMBLE J.M. Regulation of stem cell differentiation in adipose tissue by chronic inflammation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38(12):872-878.
278. YIN Y. Y COLS. Blocking effects of siRNA on VEGF expression in human colorectal cancer cells, *World Journal of Gastroenterology* 2010; 16(9):1086–1092.
279. YONENAGA Y, MORI A, ONODERA H, YASURA S, OE H, FUJIMOTO A, TACHIBANA T, IMAMURA M. Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology* 2005; 69:159-166.
280. YOUSIF M. H. M.Y COLS. The role of tyrosine kinase-mediated pathways in diabetes-induced alterations in responsiveness of rat carotid artery, *Autonomic and Autacoid Pharmacology* 2005; 25(2):69–78.

281. YU J., K.MIZUMOTO, T. KAKUTANI, A. HASEGAWA, K. OGAWA, Y Y. HATANO, Comparison of the effects of isoflurane and sevoflurane on protein tyrosine phosphorylation-mediated vascular contraction, *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2005; 49(6):852–858.
282. ZHANG Q.X., Y COLS., Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J Surg Res* 1997; 67(2):147-154.
283. ZHANG Y. Y COLS. Stromal progenitor cells from endogenous adipose tissue contribute to pericytes and adipocytes that populate the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2012; 72(20):5198-5208.
284. ZHANG Y. Y COLS. White adipose tissue cells are recruited by experimental tumors and promote cancer progression in mouse models. *Cancer Res* 2009; 69(12):5259-66.
285. ZHAO L. Y COLS. Cellular mechanism underlying the facilitation of contractile response of vas deferens smooth muscle by sodium orthovanadate, *Molecular and Cellular Biochemistry* 2012; 366(1-2):149–157.
286. ZUCKER S., MIRZA H., CONNER CE. Y COLS. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer* 1998; 75:780.